

PACSIN
und seine SH3-Bindungspartner:
Wechselwirkungen und Funktionen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Jan Dieter Modregger
aus Köln
2001

Berichtersteller

Prof. Dr. Mats Paulsson
Prof. Dr. Sigrun Korsching

Tag der mündlichen Prüfung

10. Mai 2001

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson danke ich für die interessante Themenstellung, die hervorragende Betreuung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Frau Prof. Dr. Sigrun Korsching danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens, und Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner danke ich für seine Bereitschaft, den Prüfungsvorsitz meiner Disputation zu übernehmen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Markus Plomann für die tatkräftige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der letzten Jahre bedanken.

Mein Dank gilt Frau Dr. Anne Schmidt und Herrn Prof. Dr. Wieland Huttner für ihre Unterstützung bei der Analyse der enzymatischen Aktivität von Endophilin B1.

Herrn Dr. Danilo Tagle und seinen Mitarbeitern danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Untersuchung von PACSIN 1 in *Chorea Huntington*-Gewebe.

Frau Dr. Beate Eckes und Frau Renate Knaup danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Durchflußzytometrie.

Bei allem Mitarbeitern möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Institut und ihre Hilfsbereitschaft bedanken, insbesondere bei Brigitte Ritter, Arndt Halbach, Elmar Wegener, Dieter Behrendt, Petra Weskamp, Dr. Neil Smyth, Judith-Antonia Lummerstorfer, Dr. Patrick Tunggal, Uwe Odenthal, Christian Frie, Barbara Merkl, Dr. Frank Zauke, Gertrud Pelzer und Nevres Ercan.

Dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Anni Koponen und meiner Familie danke ich für ihre ausdauernde Unterstützung und den Rückhalt, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglichten.

1 Einleitung	1
1.1 Intrazellulärer Transport	1
1.2 COPII-Vesikel	3
1.3 COPI-Vesikel	3
1.4 Clathrin-Vesikel	4
1.4.1 Clathrinvermittelte Endozytose synaptischer Vesikel	4
1.4.2 Proteinkomponenten der Endozytose synaptischer Vesikel	6
1.4.2.1 Clathrin	6
1.4.2.2 Adapterprotein 2 (AP-2)	7
1.4.2.3 AP-180	8
1.4.2.4 Eps15	9
1.4.2.5 Epsin 1	10
1.4.2.6 Intersectin/DAP160/Ese	10
1.4.2.7 Synaptojanin	11
1.4.2.8 Dynamin	12
1.4.2.9 Amphiphysin	13
1.4.2.10 Endophilin	14
1.4.2.11 PACSIN	17
1.4.3 Interaktionen der endozytotischen Proteine	19
2 Eigene Vorarbeiten	21
3 Aufgabenstellung	23
4 Ergebnisse	24
4.1 Bindungspartner von PACSIN 1	24
4.1.1 Lokalisierung der Bindungsmotive	24
4.1.1.1 Generierung von PACSIN 1-Deletionsmutanten	24
4.1.1.2 Two-Hybrid-Analysen mit PACSIN 1-Deletionsmutanten	25
4.1.1.3 Generierung von PACSIN 1-Punktmutanten	26
4.1.1.4 Two-Hybrid-Analysen mit PACSIN 1-Punktmutanten	27
4.1.2 Bindungsspezifität an PACSIN-Isoformen	28
4.1.3 Zusammenfassung der Two-Hybrid-Interaktionsstudien	29
4.2 Charakterisierung des Klon 18-1	31
4.2.1 Verifikation der PACSIN 1-Klon 18-1-Interaktion	31
4.2.2 Sequenzanalyse von Klon 18-1	32
4.2.3 Expression von Klon 18-1	33
4.2.3.1 Northern Blot	33
4.2.3.2 Western Blot	34
4.2.4 Intrazelluläre Verteilung	35
4.3 Charakterisierung von Klon 42-14	36
4.4 Charakterisierung von Endophilin B1	37
4.4.1 Sequenzanalyse des Two-Hybrid-Klons 48-9	38
4.4.2 Vergleich der Aminosäuresequenzen der Endophiline	39

4.4.3	Charakterisierung der Bindung an PACSIN 1	41
4.4.3.1	Erstellung einer Endophilin B1-Deletionsmutante	41
4.4.3.2	Two-Hybrid-Analyse der Endophilin B1-Deletionsmutante	42
4.4.4	Rekombinante Expression von Endophilin B1	43
4.4.4.1	GST-Endophilin B1 Fusionsproteine	43
4.4.4.2	HA-Fusionsprotein	45
4.4.5	Gewebespezifische Expression von Endophilin B1	45
4.4.5.1	Northern Blot	45
4.4.5.2	Western Blot	46
4.4.5.3	Genomische Organisation des humanen Endophilin B1-Gens ...	47
4.4.5.4	Hirnspezifisches Spleißen des Endophilin B1-Transkripts	48
4.4.6	LPAAT-Aktivität von Endophilin B1	49
4.4.6.1	Bindung an aktivierte Fettsäuren	49
4.4.6.2	Analyse der Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase-Aktivität ..	50
4.4.7	Bindungspartner von Endophilin	51
4.4.7.1	Präzipitation mit rekombinantem Endophilin B1	51
4.4.8	Intrazelluläre Lokalisierung von Endophilin B1	53
4.4.9	Einfluß von Endophilin B1 auf clathrinvermittelte Endozytose	54
4.5	Identifikation weiterer PACSIN 1-Interaktionen	55
4.5.1	Unbekannte PACSIN 1-bindende Proteine	56
4.5.2	Charakterisierung der PACSIN 1-Huntingtin Interaktion	56
4.5.3	Two-Hybrid-Analyse der PACSIN 1-Huntingtin-Interaktion	57
4.5.4	Spezifität der PACSIN 1-Huntingtin-Interaktion	58
4.5.5	Zusammenfassung der PACSIN 1-Huntingtin-Interaktion	59
4.6	PACSIN 1 und Endophilin B1 in Chorea Huntington	59
4.6.1	Klonierung von pathologischem Huntingtin	60
4.6.2	Two-Hybrid-Bindungsstudien	61
4.6.3	Einfluß der Polyglutamin-Länge auf die Interaktionen	61
4.6.4	PACSIN 1-Interaktionen in pathologischem Gewebe	63
4.6.5	Nachweis von PACSIN 1 in Chorea Huntington-Gewebeschnitten	64
4.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	66

5 Diskussion67

5.1	Bindungspartner von PACSIN 1	67
5.1.1	Two-Hybrid-Klon 18-1	68
5.1.2	Two-Hybrid-Klon 42-14	69
5.1.3	Endophilin B1	69
5.1.3.1	Sequenzanalyse von Endophilin B1	70
5.1.3.2	Interaktion mit PACSIN 1	70
5.1.3.3	LPAAT-Aktivität von Endophilin B1	71
5.1.3.4	Expression und Spleißen von Endophilin B1	71
5.1.3.5	Intrazelluläre Verteilung und Interaktionen von Endophilin B1 ..	72
5.1.3.6	Endophilin B1 und clathrinvermittelte Endozytose	73
5.1.3.7	Zusammenfassung Endophilin B1	73
5.1.4	Huntingtin	74
5.2	PACSIN 1 und Endophilin B1 in Chorea Huntington	75

5.2.1 Chorea Huntington	75
5.2.2 Huntingtin-PACSIN 1-Interaktionen	77
5.2.3 Huntingtin-Endophilin B1-Interaktionen	80
5.3 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	81
6 Material und Methoden	83
6.1 Verwendete Materialien	83
6.2 Methoden	83
6.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden	83
6.2.2 Gerichtete Mutagenese	87
6.2.3 Two-Hybrid-Bindungsanalysen	90
6.2.4 Allgemeine proteinchemische Methoden	91
6.2.5 Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine	92
6.2.6 Herstellung spezifischer Antikörper	93
6.2.7 Protein-Interaktionsnachweis („Pull down“)	93
6.2.8 Protein-Interaktionsnachweis („Overlay“)	93
6.2.9 Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen	94
6.2.10 Immunfluoreszenz-Analysen in eukaryotischen Zellen	94
6.2.11 Endozytose-Nachweis mittels Durchflußzytometrie	94
7 Anhang	96
7.1 Verwendete Abkürzungen	96
7.2 Plasmide	98
7.3 cDNA-Banken und cDNA-Klone	98
7.4 cDNA-Sequenzen	99
7.4.1 Two-Hybrid-Klon 18-1	99
7.4.2 Endophilin B1	100
7.5 Oligonukleotide	101
7.6 Antikörper	102
7.6.1 Primärantikörper	102
7.6.2 Sekundärantikörper	102
7.6.3 Molekulargewichtsstandards für Proteine	103
7.7 Biologisches Material	103
7.7.1 Bakterienstämme (Escherichia coli)	103
7.7.2 Hefestämme (Saccharomyces cerevisiae)	103
7.7.3 Eukaryotische Zellen	104
8 Literatur	105

1 Einleitung

1.1 Intrazellulärer Transport

Der selektive vesikuläre Transport von zellulären Komponenten zwischen den einzelnen Kompartimenten einer Zelle, der Plasmamembran und der Umgebung der Zelle dient der Ausübung verschiedenster zellulärer Funktionen und dem Erhalt der spezialisierten Membranen.

Neu hergestellte lumenale oder transmembrane Proteine werden durch das Endoplasmatische Retikulum (ER) mit Hilfe von Vesikeln in den Golgi-Apparat transportiert, dort modifiziert, zum Weitertransport in die verschiedenen Organellen oder zur Sekretion sortiert und wiederum in Vesikel verpackt. Durch Endozytose werden verschiedene Substanzen von außerhalb in Vesikeln eingeschlossen und in die Zelle aufgenommen. Komponenten der Plasmamembran werden kontinuierlich über clathrinvermittelte Endozytose internalisiert und in Endosomen sortiert, um entweder zur Plasmamembran zurücktransportiert oder in den Lysosomen degradiert zu werden.

In der rezeptorvermittelten Endozytose werden Zelloberflächenrezeptoren nach Ligandenbindung über Vesikel internalisiert und fusionieren mit Endosomen. Dort löst sich meist der Ligand vom Rezeptor aufgrund des sauren pH-Wertes, der in verschiedenen Typen der Endosomen zwischen 5,5 und 6,5 liegt, und der Rezeptor kann zur Plasmamembran zurücktransportiert werden. Zur Verminderung der Rezeptoranzahl werden überschüssige Rezeptoren in die Lysosomen transportiert und dort degradiert. In der sogenannten Transzytose werden Rezeptoren mit ihren Liganden durch Endosomen zu anderen Plasmamembranbereichen transportiert, an denen sie den Ligand freisetzen.

Jeder der zuvor beschriebenen Membrantransportvorgänge durch Vesikel erfordert zwei Fusionsschritte von Lipiddoppelschichten. Einerseits fusionieren Vesikel mit ihrer Zielmembran, indem Rezeptoren in der Vesikelmembran (v-SNAREs, vesicular SNAP-receptor) über N-Ethylmaleimid-sensitive Fusionsproteine (NSF) und lösliche NSF-bindende Proteine (SNAP, soluble NSF attachment proteins) an Rezeptoren in der Zielmembran (t-SNARE, target SNAP receptor) binden. Diese Bindung wird durch GTPasen der Rab-Proteinfamilie im GTP-gebundenen Zustand reguliert, anschließend führt die GTP-Hydrolyse zu einer Fusion von Vesikel und Zielmembran.

Andererseits werden Membranfusionen auch zur Abschnürung der Vesikel von ihrer Donormembran benötigt. Zur Abschnürung der Transportvesikel mittels Hüllproteinen von Donormembranen werden zwei übergeordnete Modelle verwendet, die sich nicht not-

wendigerweise ausschließen, aber die Vielfalt an unterschiedlichen Donormembranen und Vesikelarten besser beschreiben.

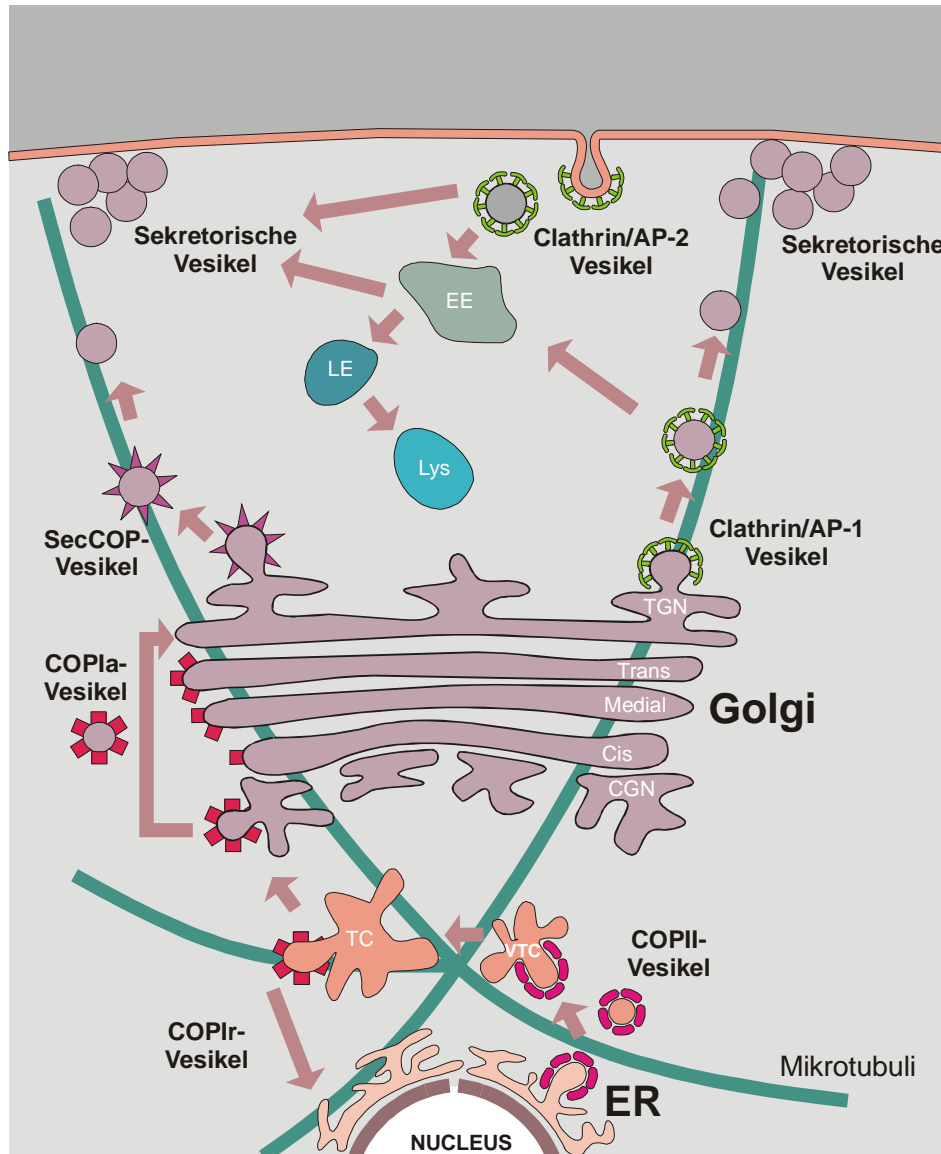


Abbildung 1-1. Vesikeltransport innerhalb der Zelle. Neu synthetisierte Proteine aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) werden über COPII-umhüllte Vesikel über vesikuläre bzw. tubuläre Komplexe (VTC) und später Transportkomplexe (TC) zum Golgi-Apparat transportiert. Zum anterograden Transport innerhalb des Golgi wird COPI als Hüllprotein eingesetzt (COPIa), um Vesikel vom Cis-Golgi-Netzwerk (CGN), Cis-, Medial und Trans-Golgi-Zisternen abzuschneiden. Das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) verlassen sekretorische Vesikel über sekretorisches Coatomer (SecCOP) und Clathrin/Adapterprotein 1-(AP-1-) Hüllen, die auch für Transportvesikel zu Endosomen (EE, frühe Endosomen; LE, späte Endosomen) und Lysosomen (Lys) eingesetzt werden. Clathrin zusammen mit dem Adapterprotein 2 (AP-2) dient der Vesikelabschnürung an der Plasmamembran. Der retrograde Transport von Golgi zu intermediären Kompartimenten und ER erfolgt über COPI-Vesikel (COPIr).

In Modellen der clathrinvermittelten Vesikelbildung geht man davon aus, daß die Abschnürung der Vesikel zwingend entsprechende Proteine voraussetzt, die direkt die

Fusion der Membranen auslösen, während sich in einem anderen Modell die Vesikel von selbst bilden, wenn sich Membraneinstülpungen durch äußere Einwirkung immer weiter verengen. Die kontinuierliche Einwölbung der Membran durch eine Reihe von polymerisierenden Hüllproteinen reicht in diesem Modell aus, um letztendlich die Ablösung der Vesikel zu erreichen. Für dieses Modell sprechen die Erkenntnisse aus Untersuchungen der Vesikelbildung am Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat durch die Coatomere COPI (coat protein I) und COPII (coat protein II) als Vesikelhüllen.

1.2 COPII-Vesikel

COPII-umhüllte Vesikel werden für den Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat benutzt (Abbildung 1-1) und stellen die einfachste Form der mit Proteinhüllen gebildeten Vesikel dar. Die für die Vesikelbildung benötigten Proteinkomplexe sind im Vergleich zu COPI- und clathrinumhüllten Vesikeln deutlich einfacher und können aus nur fünf zytosolischen Komponenten *in vitro* rekonstruiert werden (Barlowe *et al.*, 1994). Der Sec23p-Sec24P-Komplex ist vermutlich für die Erkennung der zu transportierenden Komponenten verantwortlich (Springer und Schekman, 1998; Peng *et al.*, 2000). Zusammen mit der kleinen GTPase Sar1p als molekularem Schalter in der GTP-gebundenen Form und Sec12p als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF; Barlowe und Schekman, 1993) wird der Sec13p-Sec31p-Komplex rekrutiert (Barlowe *et al.*, 1994), der die Deformation der Membran und die Abschnürung der Vesikel auslöst. Anschließend stimuliert Sec23p die GTP-Hydrolyse und Freisetzung von Sar1p-GDP, die vermutlich zur Ablösung der Proteinhülle vom neu gebildeten Vesikel führt (Kirchhausen, 2000).

1.3 COPI-Vesikel

COPI-umhüllte Vesikel werden für verschiedene intrazelluläre Transportvorgänge eingesetzt (Abbildung 1-1) und werden von einer komplexeren Proteinmaschinerie von der Donormembran abgelöst als COPII-Vesikel (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1998; Kirchhausen, 2000). Neben dem retrograden Membrantransport vom Golgi-Apparat und ER-Golgi-Zwischenstufen zurück zum Endoplasmatischen Retikulum (COPI_r; Spang und Schekman, 1998) sind COPI-Varianten auch am anterograden Transport zwischen den Golgi-Zisternen beteiligt (COPI_a; Guo *et al.*, 1994; Schekman und Orci, 1996). Zu Beginn der Vesikelbildung bindet die aktive, GTP-gebundene Form der GTPase ARF1 (ADP ribosylation factor 1) über einen Myristoyl-Rest an die zugehörige Donormembran und rekrutiert den COPI-Coatomer-Komplex (Donaldson *et al.*, 1992). Das COPI-Coatomer ist ein Komplex aus sieben Proteinen, bindet die zu sortierenden und zu transportierenden Proteine und deformiert über die Hüllenbildung die Donormembran (Rothman, 1994; Springer und Schekman, 1998), so daß es zur Ablösung der Vesikel kommt. Durch

GTP-Hydrolyse kommt es zu einer Konformationsänderung von ARF1, die die Internalisierung des Myristoyl-Ankers beinhaltet und so die Ablösung von ARF1 und danach der gesamten Hülle vom neu gebildeten Vesikel erreicht (Goldberg, 1999, 2000).

1.4 Clathrin-Vesikel

Die Vesikelbildung mit Hilfe einer Clathrin-Hülle ist die komplizierteste Form der Vesikelabschnürung und erfordert weitaus mehr Proteinkomponenten als die bisher beschriebenen Coatomer-vermittelten Vesikelabschnürungen. Die Ausbildung der Clathrin-Hülle setzt die Bindung verschiedener Adapter-Proteine (AP-Komplexe, AP180) an die Membran voraus, bis dann die Vesikel von Proteinen wie Dynamin, Endophilin und Synaptojanin abgeschnürt werden, die direkt auf die Vesikelhäse wirken. Anschließend wird die Clathrin-Hülle von den freigesetzten Vesikeln abgelöst (Abbildung 1-2).

Die clathrinvermittelte Vesikelbildung wird hauptsächlich zur rezeptorvermittelten Endozytose und zur Ablösung von Transportvesikeln vom Trans-Golgi-Netzwerk zu endosomalen und lysosomalen Kompartimenten verwendet (Abbildung 1-1). Verschiedene Zellen, die auf die Sekretion von kleinen Molekülen (z. B. Histamin) oder Proteinen (wie z. B. Hormone oder Verdauungsenzyme) spezialisiert sind, konzentrieren diese Substanzen in sekretorischen Vesikeln, die sich als clathrinumhüllte Vesikel am Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) bilden und auf ein äußeres Signal mit der Plasmamembran fusionieren. Eine spezielle Form der sekretorischen Vesikel sind die synaptischen Vesikel, die sich aus Endosomen oder direkt durch Endozytose bilden. Sie enthalten synaptische Botenstoffe wie Acetylcholin, Glutamat oder γ -Aminobuttersäure (GABA) und können in sehr kurzer Zeit mit den synaptischen Membranen fusionieren. Anschließend werden die Vesikel durch clathrinvermittelte Endozytose recycelt. Am besten charakterisiert sind diese endozytotischen Prozesse an presynaptischen Membranen.

1.4.1 Clathrinvermittelte Endozytose synaptischer Vesikel

Die clathrinvermittelte Endozytose dient dem Recycling von synaptischen Vesikeln an presynaptischen Membranen und dem Rezeptorrecycling an postsynaptischen Membranen. Die wesentlichen Elemente dieses Vesikelabschnürungsprozesses unterscheiden sich nicht von der allgemeinen clathrinvermittelten Endozytose, weisen jedoch einige für synaptische Membranen charakteristische Unterschiede auf.

Im Gegensatz zur konstitutiv-aktiven oder ligandenstimulierten clathrinvermittelten Endozytose dient die Endozytose an presynaptischen Membranen dem Erhalt des Membrangleichgewichts bei exozytotischen Prozessen. So zeigen sich in ruhenden Synapsen kaum clathrinumhüllte Vesikel. Fusionieren bei hoher exozytotischer Aktivität jedoch viele synaptische Vesikel mit der presynaptischen Membran, bilden sich in synaptischen

Randbereichen, den sogenannten endozytotischen Zonen, in sehr kurzer Zeit viele clathrinumhüllte Vesikel.

Obwohl die genaue zeitliche und räumliche Abfolge der einzelnen Schritte nur schwer zu analysieren ist, wird vom folgenden Modell ausgegangen, um das schnelle Recycling synaptischer Vesikel zu erklären (Abbildung 1-2). Im initialen Schritt der Vesikelbildung lagern sich die verschiedenen clathrinbindenden Adapterproteine AP-2 (Adapter-Protein 2) und AP180 (Adapter-bindendes Protein 180) an der Membran in Komplexen an. Diese Membranassoziation wird durch Epsin, Eps15 und Intersectin kontrolliert und ist zum Teil von der Phosphorylierung/Dephosphorylierung dieser Proteine abhängig. Die in diesen Proteinen vorhandenen Protein-Protein-Interaktionsdomänen sind für den korrekten Aufbau des Clathrin-Netzwerkes verantwortlich.

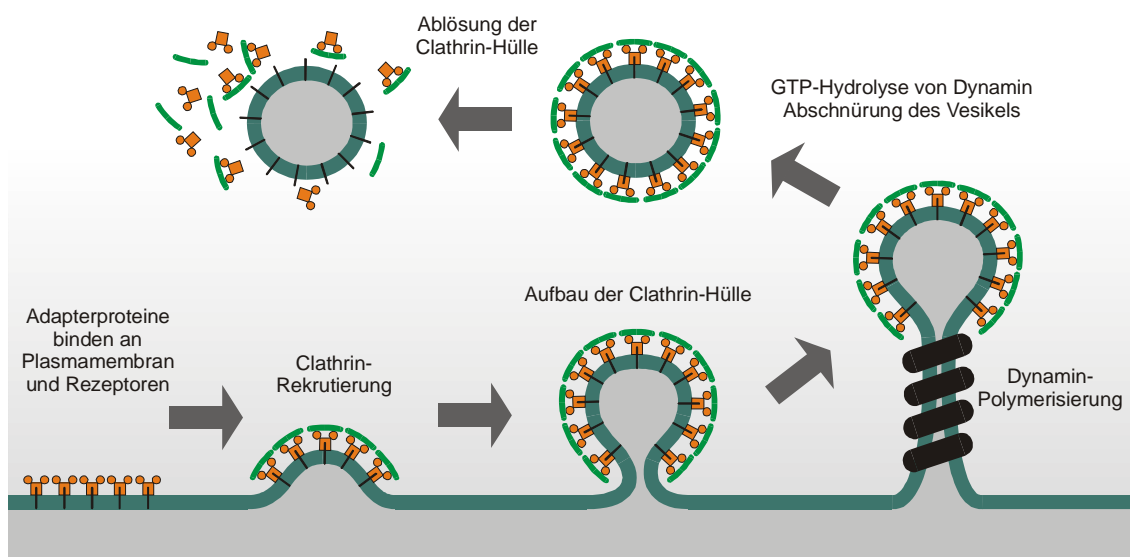


Abbildung 1-2. Endozytose synaptischer Vesikel. Nach der Bindung der Adapterproteine an Bestandteile der Membran werden Clathrin-Triskelien rekrutiert, die eine stabile Hülle um die Vesikel bilden. Anschließend polymerisiert Dynamamin mit seinen Bindungspartnern um den Vesikelhals und schnürt diesen unter GTP-Hydrolyse ab. Nach der Freisetzung der Vesikel wird die Clathrin-Hülle entfernt und zerfällt in die einzelnen Komponenten.

Durch die weitere Clathrin-Polymerisierung kommt es zu einer Einstülpung der Membran, die durch membranverändernde Proteine wie Endophilin 1 unterstützt wird. Nach der Verengung des Vesikelhalses polymerisiert Dynamamin 1 in ringförmigen Strukturen um diesen herum. Schließlich kommt es nach GTP-Hydrolyse zu einer Konformationsänderung von Dynamamin und einer damit verbundenen Streckung der Dynamaminringe sowie der Ablösung der Vesikel von der Donormembran. Nach der Entfernung der Vesikelhülle durch die Proteine Synaptojanin 1 und Endophilin 1 können die Vesikel z. B. durch Actin-Polymerisierung und später entlang der Mikrotubuli zu ihren Bestimmungsorten

transportiert werden, an denen die Vesikelinhalte weiterverarbeitet bzw. synaptische Vesikel erneut mit Botenstoffen beladen werden.

Die Kinetik des Recyclings der presynaptischen Membran ist wesentlich schneller als in anderen untersuchten Systemen. Während bei der allgemeinen Endozytose die vom Clathrin-Mantel befreiten Vesikel rasch mit frühen endosomalen Kompartimenten fusionieren, kann in Synapsen die endosomale Sortierung umgangen werden. Auch existieren die beteiligten Proteine häufig in für Synapsen spezifischen Isoformen oder Spleißvarianten und werden besonders stark in Synapsen exprimiert.

1.4.2 Proteinkomponenten der Endozytose synaptischer Vesikel

In den aktuellen Modellen wird davon ausgegangen, daß die Endozytose synaptischer Vesikel mit der Anlagerung und Formation des aus vier Untereinheiten bestehenden AP-2-Komplexes initiiert wird. Anschließend beginnt die Rekrutierung und Polymerisation von Clathrin. Dieser kooperative Prozeß, bei dem die Bildung eines Clathrin-Oligomers die zusätzliche Anlagerung neuer Clathrin-Moleküle an den Komplex erleichtert, führt im weiteren Verlauf zur Einstülpung der Membran bis hin zur tiefen Membraninvagination. Nach Ablösung der neugebildeten Vesikel von der Donormembran verlieren freie clathrinumgebene Vesikel in der Regel rasch ihre Proteinhülle (Abbildung 1-2).

Die wichtigsten Hüllproteine der endozytotischen synaptischen Vesikel sind Clathrin und das Adapterprotein 2 (adaptor protein 2, AP-2).

1.4.2.1 Clathrin

Ein Clathrin-Molekül besteht aus je drei leichten und drei schweren Untereinheiten, die zusammen einen stabilen Proteinkomplex in der Form eines Triskelions bilden (Abbildung 1-3). Jeder Arm der Triskelia stellt eine rechtsgängige Superhelix dar, die sich aus kurzen α -helicalen Haarnadeln zusammensetzt und die Kanten des Clathrin-Netzwerkes formt. An den Enden der Arme befinden sich Protein-Protein-Interaktionsdomänen aus siebenblättrigen β -Propellerstrukturen der aminoterminalen Region der schweren Clathrin-Untereinheiten, die ein kurzes Peptidmotiv, die sogenannte „clathrin-box“, erkennen. Dieses Bindungsmotiv findet sich sowohl in verschiedenen Clathrin-Adapterproteinen als auch in weiteren am endozytotischen Prozeß beteiligten Proteinen.

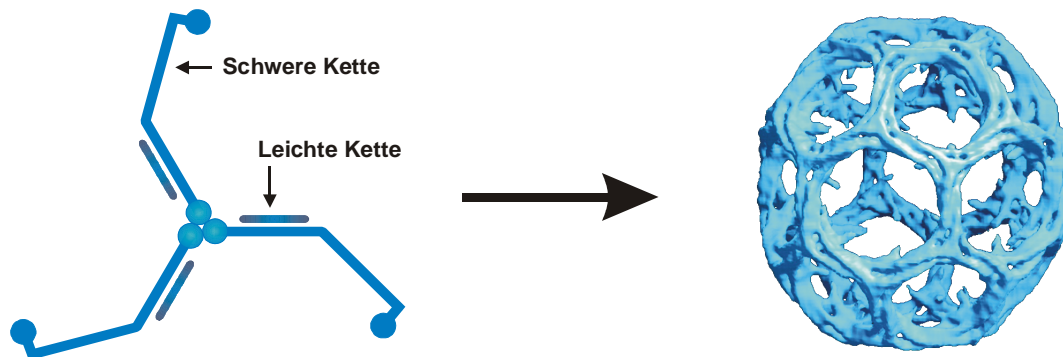


Abbildung 1-3. Clathrin. Ein Clathrin-Triskelion bildet sich aus drei schweren (170 kDa) und drei leichten Ketten (35 kDa). Die aminoterminalen Domänen der schweren Ketten dienen der Membranassoziation über Adapterproteine, während die carboxyterminale Domäne zur Trimerisierung der schweren Ketten benötigt wird. Die Arme des Triskelions interagieren mit den Armen weiterer Triskelia und bilden die Kanten des Clathrin-Netzes (21Å-elektronenmikroskopische Abbildung (rechts) entnommen aus Smith *et al.*, 1998).

Die Flexibilität des Clathrin-Triskelions ermöglicht die Oligomerisierung zu hexagonalen und pentagonalen Strukturen mit gleichmäßiger Membranwölbung ähnlich der eines Fußballs.

1.4.2.2 Adapterprotein 2 (AP-2)

Der als Adapterprotein 2 bezeichnete Proteinkomplex besteht aus vier verschiedenen Untereinheiten, α -Adaptin, β 2-Adaptin, μ 2-Adaptin und σ 2-Adaptin und weist Ähnlichkeiten zu den Adapterkomplexen AP-1, AP-3 und AP-4 auf (Hirst und Robinson, 1998; Hirst *et al.*, 1999).

Die Kernregion des AP-2 bindet an Membranproteine wie Synaptotagmin und andere Proteine mit endozytotischen Motiven (Haucke und De Camilli, 1999), jedoch auch direkt an Membranlipide wie Phosphoinositole und andere saure Phospholipide (Arneson *et al.*, 1999; Gaidarov und Keen, 1999). Die Interaktion mit Clathrin wird hauptsächlich über β 2-Adaptin vermittelt (Owen *et al.*, 2000). Eine der zwei kooperativen Bindungsstellen befindet sich in der sogenannten „Ohr-Domäne“, die aus der kompakten Struktur herausragt, und eine weitere mit einer charakteristischen „clathrin-box“ ist in der Verbindungsregion (hinge region) der „Ohr-Domäne“ zur kompakten Kernstruktur lokalisiert (Abbildung 1-4).

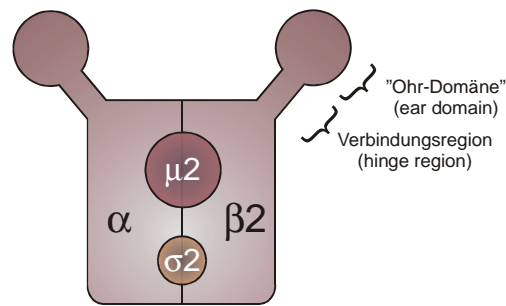


Abbildung 1-4. Adapterprotein 2. Der AP-2-Komplex besteht aus einer 100 kDa α -, einer 100 kDa β 2-, einer 50 kDa μ 2 und einer 19 kDa großen σ 2-Untereinheit, die auch als Adaptine bezeichnet werden.

Der AP-2-Komplex interagiert über die „Ohr-Domänen“ von α - und β 2-Adaptin mit vielen weiteren an der Endozytose beteiligten Proteinen, die meist als Bindungsmotiv Asparaginsäure-Prolin- θ (DP θ , mit θ als beliebiger hydrophober Aminosäure) enthalten. Das DP θ -Motiv bindet an eine hydrophobe, von polaren Aminosäuren umgebene Tasche in den strukturell sich sehr ähnlichen „Ohr-Domänen“ von α - und β 2-Adaptin (Owen *et al.*, 1999, 2000; Traub *et al.*, 1999).

1.4.2.3 AP-180

Das hirnspezifische Adapter-bindende Protein 180 befindet sich hauptsächlich in Synapsen, hat in CALM (clathrin assembly lymphoid myeloid leukaemia protein; Tebar *et al.*, 1999) einen ubiquitär exprimierten Verwandten und bildet ähnlich wie AP-2 eine Verbindung zwischen der Membran und Clathrin (Ahle und Ungewickell, 1986). In älteren Publikationen wird AP-180 auch noch als Adapter-Protein 3 (AP-3) bezeichnet, heute wird diese Bezeichnung für einen weiteren tetrameren Komplex aus δ -Adaptin, β 3-Adaptin, μ 3-Adaptin und σ 3-Adaptin verwendet.

Obwohl AP-180 ein aminoterminalen „clathrin-box“-Motiv enthält, wird die Bindung an Clathrin über sich wiederholende Asparaginsäure-Leucin-Leucin-(DLL-)Motive im carboxyterminalen Ende vermittelt (Morgan *et al.*, 2000). AP-180 bindet ebenfalls an die „Ohr-Domänen“ von AP-2 (Wang *et al.*, 1995; Traub *et al.*, 1999), anschließend interagiert der Komplex aus AP-180 und AP-2 sehr viel stärker mit Clathrin als beide Proteine einzeln (Hao *et al.*, 1999). Die aminoterminalen Domäne weist Ähnlichkeit zur aminoterminalen Domäne von Epsin (ENTH, Epsin aminoterminalen homologe Domäne) auf, einem weiteren an der clathrinvermittelten Endozytose beteiligten Protein (Abbildung 1-5).

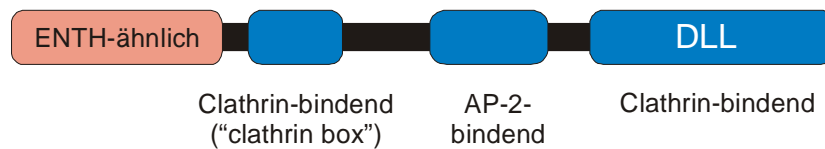


Abbildung 1-5. AP-180. Das 85 kDa große Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 180 kDa in der SDS-PAGE besitzt neben einer ENTH-ähnlichen Domäne Clathrin- und AP-2-Bindungsdomänen.

In *in vitro*-Experimenten mit gereinigten Proteinen kontrolliert AP-180 die Größe und Homogenität der sich bildenden Clathrin-Hüllen. In Gegenwart von AP-180 gebildete Clathrin-Hüllen sind kleiner und haben eine gleichmäßigere Größe als solche ohne AP-180 (Ye und Lafer, 1995). Diese Ergebnisse konnten anhand von Null-Mutanten der zu AP-180 homologen Gene in *Drosophila melanogaster* (Zhang *et al.*, 1998) und *Caenorhabditis elegans* (Nonet *et al.*, 1999) *in vivo* bestätigt werden. Desweiteren wird das in synaptischen Vesikeln vorkommende Protein Synaptobrevin teilweise delokalisiert in der Plasmamembran gefunden (Zhang *et al.*, 1998). Es wird daher angenommen, daß AP-180 an der direkten Bildung synaptischer Vesikel aus clathrinumhüllten endozytotischen Vesikeln beteiligt ist.

1.4.2.4 Eps15

Eps15, ursprünglich als Substrat der Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptortyrosinkinase identifiziert, stellt ein wichtiges Adapterprotein mit mehreren Protein-Protein-Interaktionsmotiven dar, das an der Regulation der clathrinvermittelten Endozytose beteiligt ist (Tebar *et al.*, 1996). Drei aminoterminalen Eps15 homologe (EH-) Domänen sind über eine Coiled-coil-Region mit einer carboxyterminalen Domäne verbunden (Abbildung 1-6), die mehrere Wiederholungen des Aminosäuremotivs Asparaginsäure-Prolin-Phenylalanin (DPF) und prolinreiche Sequenzen beinhaltet (Salcini *et al.*, 1999). Eps15 bindet mit der DPF-Region direkt an den AP-2-Komplex und mit den prolinreichen Motiven an die Tyrosinkinase Crk (Schumacher *et al.*, 1995; Benmerah *et al.*, 1996). Über die EH-Domänen interagiert es mit einer Spleißvariante von Synaptojanin, Numb, Rab und Epsin (Haffner *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998; Mayer, 1999).



Abbildung 1-6. Eps 15. Die EH-Domänen des 100 kDa großen Proteins interagieren mit verschiedenen an der Endozytose beteiligten Proteinen wie Epsin und der ubiquitären Form von Synaptojanin. Die zentrale Coiled-coil-Region dient der Homodimerisierung und der Heterodimerisierung mit Intersectin, während die carboxyterminale DPF-Region mit dem AP-2-Komplex interagiert.

Die Überexpression einer Deletionsmutante ohne die EH-Domänen verhindert die Rekrutierung des AP-2 Komplexes zur Plasmamembran, so daß die clathrinvermittelte Endozytose zum Erliegen kommt (Benmerah *et al.*, 1999). Dynamin ist in diesen Zellen homogen an der Plasmamembran verteilt und zeigt kein punktuelltes Muster mehr, da sich keine clathrinumhüllten Invaginationen mehr bilden. Eps15 scheint daher eine entscheidende Funktion bei der Zielsteuerung des AP-2-Komplexes zur Plasmamembran in einer frühen Phase der clathrinvermittelten Endozytose zu übernehmen.

1.4.2.5 Epsin 1

Ein wichtiger Bindungspartner von Eps15 in Synapsen ist Epsin 1, das mit seinen carboxyterminalen Asparagin-Prolin-Phenylalanin-(NPF-) Motiven an die EH-Domänen von Eps 15 bindet (Abbildung 1-7; Chen *et al.*, 1998). Die zentrale Region mit mehreren Asparaginsäure-Prolin-Tryptophan-(DPW-) Aminosäuremotiven dient der Interaktion mit dem AP-2-Komplex (Chen *et al.*, 1998; Rosenthal *et al.*, 1999). Diese Bindung von Epsin an die α -Adaptin-Untereinheit des AP-2-Komplexes ist abhängig von der Phosphorylierung Epsins durch mitotische Kinasen (Chen *et al.*, 1999). Im phosphorylierten Zustand bindet Epsin nicht mehr an den AP-2-Komplex und unterbindet so die korrekte Formation des Clathrin-Mantels um sich bildende Vesikel. Die Epsin aminoterminal homologe (ENTH) Domäne weist Ähnlichkeiten zu VHS-Domänen auf, die in einigen Vesikel-Proteinen wie Vps27p, Hrs und STAM zu finden sind (Kay *et al.*, 1999; Rosenthal *et al.*, 1999; Mao *et al.*, 2000).



Abbildung 1-7. Epsin 1. Das 94 kDa große Epsin 1 verknüpft mit seiner AP-2/Clathrin-bindenden zentralen Domäne und den EH-Domänen-bindenden NPF-Motiven mehrere Proteine, die an der Rekrutierung und Formierung der Clathrin-Hülle beteiligt sind.

In Übereinstimmung mit der Unterbrechung der Epsin-AP-2-Interaktion durch Phosphorylierung inhibieren auch Mikroinjektionen von rekombinanter DPW-Region oder Epsin-spezifischer Antikörper in Zellen die clathrinvermittelte Endozytose (Chen *et al.*, 1998, 1999). Epsin scheint daher eine wichtige Rolle in der phosphorylierungsabhängigen Regulation der clathrinvermittelten Endozytose zu spielen.

1.4.2.6 Intersectin/DAP160/Ese

Die aus verschiedenen Spezies isolierten und unter den verschiedenen Namen Intersectin, DAP160 und Ese publizierten Multi-Domänen-Proteine der Intersectinfamilie enthalten

zwei aminoterminalen EH-Domänen, welche mit NPF-Motiven interagieren können und fünf carboxyterminale Src-homologe-3- (SH3-) Domänen (Roos und Kelly, 1998; Husain *et al.*, 1999; Sengar *et al.*, 1999). Sie stellen Adapterproteine dar, die über eine Coiled-Coil-Region dimerisieren oder mit Eps15 interagieren und über eine der SH3-Domänen die intrazelluläre Verteilung von Dynamin kontrollieren. Mit Hilfe der EH-Domänen bindet Intersectin an die NPF-Motive der Epsin-Proteine.



Abbildung 1-8. Intersectin. Die kurze Isoform (145 kDa) besitzt neben den NPF-bindenden EH-Domänen fünf SH3-Domänen, die unterschiedliche Bindungsspezifitäten aufweisen. Die längere Isoform (200 kDa) ist in Vergleich zur kurzen Isoform carboxyterminal um eine Disabled-Domäne und eine Pleckstrin-homologe Domäne erweitert.

Überexpression von Intersectin inhibiert die Endozytose clathrinumhüllter Vesikel, vermutlich indem das Gleichgewicht der diversen Bindungspartner in endozytotischen Komplexen gestört wird und sich nichtfunktionale Teilkomplexe bilden (Sengar *et al.*, 1999). Weitere Bindungspartner der verschiedenen SH3-Domänen sind die synaptischen Proteine Synaptojanin und Synapsin (Roos und Kelly, 1998).

1.4.2.7 Synaptojanin

Das in verschiedenen Isoformen und Spleißvarianten vorkommende Synaptojanin hat vermutlich unterschiedliche Funktionen während des endozytotischen Prozesses (McPherson *et al.*, 1994; Haffner *et al.*, 1997). Primär stellt Synaptojanin eine Polyphosphoinositid-Phosphatase dar, die die für endozytotische Prozesse wichtige Phosphoinositid-Menge reguliert.

Aufgebaut ist Synaptojanin aus zwei Inositol-Phosphatase-Domänen, die den Inositolring an zwei unterschiedlichen Positionen dephosphorylieren, sowie einer carboxyterminalen prolinreichen Domäne, die für Interaktionen mit Proteinen verantwortlich ist, die SH3-Domänen enthalten (Abbildung 1-9; McPherson *et al.*, 1996; de Heuvel *et al.*, 1997). Spleißen in der carboxyterminalen Region von Synaptojanin läßt viele verschiedene Isoformen mit unterschiedlicher intrazellulärer Verteilung und Gewebespezifität entstehen (Woscholski *et al.*, 1998; Kudo *et al.*, 1999), von denen insbesondere die 145 kDa große Variante von Synaptojanin 1 in Synapsen an clathrinumhüllten Vesikel-Übergangszuständen angereichert ist (McPherson *et al.*, 1994).

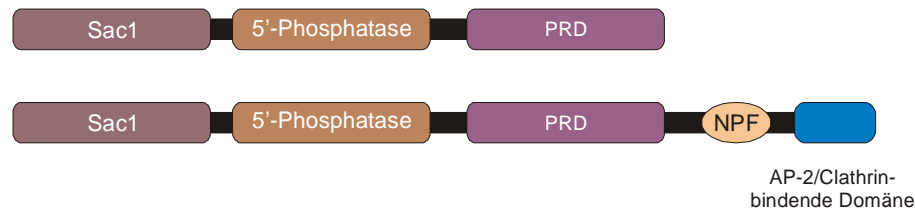


Abbildung 1-9. Synaptojanin 1. Die kurze Isoform (145 kDa) wird hirspezifisch exprimiert, während die 170 kDa große Isoform mit zusätzlichen NPF-Motiven und einer Clathrin-bindenden Domäne in allen Geweben vorkommt. Die zentrale Domäne spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Phosphatidylinositol-4-phosphat, die aminoterminalen SAC1-ähnliche Domäne besitzt Phosphatidylinositol-4-phosphat-Phosphataseaktivität (Guo *et al.*, 1999).

Das Hauptsubstrat von Synaptojanin ist Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, das zu Phosphatidylinositol gespalten wird und die Clathrin-Umhüllung, die Aktivität von Dynamin sowie die Neubildung von Actinfilamenten reguliert (Schmid *et al.*, 1998; Arneson *et al.*, 1999; Rohatgi *et al.*, 1999).

1.4.2.8 Dynamin

Die GTPase Dynamin 1 besitzt eine Schlüsselrolle in der Abschnürung der clathrinumhüllten Vesikel in Synapsen (Schmid *et al.*, 1998). Neben Dynamin 1 sind die weiteren Familienmitglieder Dynamin 2 und 3 bekannt, die einen ähnlichen Aufbau wie Dynamin 1 (Abbildung 1-10) aufweisen, jedoch in unterschiedlicher intrazellulärer Verteilung und anderer Gewebespezifität vorkommen (Cao *et al.*, 1998; McNiven *et al.*, 2000).

Dynamin polymerisiert in ring- bzw. spiralförmigen Strukturen um Vesikelhäuse, um anschließend durch eine Konformationsänderung unter GTP-Hydrolyse die Vesikel von der Donormembran abzuschnüren (Sweitzer und Hinshaw, 1998; Stowell *et al.*, 1999). Diese Funktion von Dynamin als abschnürendes Mechanoenzym in der Vesikelbildung muss jedoch nach neueren Untersuchungen in Frage gestellt werden (Takei *et al.*, 1999). Möglicherweise kontrolliert Dynamin als molekularer Schalter wie andere GTPasen ein Effektorsystem aus weiteren Proteinen, die durch den GTP-gebundenen Zustand von Dynamin die eigentliche Vesikelabschnürung veranlassen. Die Aktivität von Dynamin wird durch mehrere Faktoren wie zum Beispiel Lipide (Phosphoinositide; Lee *et al.*, 1999; Vallis *et al.*, 1999), den Oligomerisierungsgrad (Warnock *et al.*, 1996; Sever *et al.*, 1999) und durch verschiedene Bindungspartner reguliert, die über SH3-Domänen mit der carboxyterminalen prolinreichen Domäne von Dynamin interagieren (Okamoto *et al.*, 1997).



Abbildung 1-10. Dynamin 1. Das 100 kDa große Protein besitzt neben der GTPase-Domäne eine Pleckstrin-ähnliche Domäne (pleckstrin homology, PH) zur Interaktion mit Lipiden und eine prolinreiche Domäne (PRD), die an SH3-Domänen bindet. Die GTPase-Effektor-Domäne (GTPase enhancing/effector domain, GED) führt nach Polymerisation von Dynamin zu einer starken Erhöhung der GTPase-Aktivität.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen einer temperatursensitiven Mutante des Dynamin-Gens *shibire* in *Drosophila melanogaster* ergaben eine Unterbrechung des endozytotischen Prozesses mit tief invaginierten Membranen und einem elektronendichten Ring um den Hals dieser Vesikelvorstufen (Koenig und Ikeda, 1989). Dies führte zur Hypothese, daß dynaminumringte Vesikelhälse einen intermediären Schritt bei der Abschnürung der Vesikel darstellen. In *in vitro*-Experimenten mit einem nicht hydrolysierbaren GTP-Analog, Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat) (GTP γ S), bilden sich ebenfalls die schon in der *shibire*-Mutante beobachteten Ringe aus Dynamin sowie den Bindungspartnern Amphiphysin und Endophilin (Takei *et al.*, 1995; Carr und Hinshaw, 1997; Slepnev und De Camilli, 2000).

1.4.2.9 Amphiphysin

Die Proteine der Amphiphysin-Familie sind vermutlich multifunktionale Adapter, die die zur Endozytose benötigten Proteine zur Membran rekrutieren (Wigge und McMahon, 1998). Sowohl das überwiegend im Gehirn exprimierte Amphiphysin 1 als auch das in vielen gewebespezifischen Spleißvarianten vorkommende Amphiphysin 2 beinhalten in der aminoterminalen Region eine Lipidbindungsstelle und ein Modul zur Oligomerisierung (BIN-Amphiphysin-RVS- (BAR-) Domäne; Ramjaun *et al.*, 1999; Ge und Prendergast, 2000). Der zentrale Bereich der Amphiphysinmoleküle ist für die Interaktionen mit der schweren Kette von Clathrin und der „Ohr-Domäne“ der α -Adaptin-Untereinheit des AP2-Komplexes verantwortlich (Ramjaun und McPherson, 1998; Slepnev *et al.*, 2000). Die carboxyterminale SH3-Domäne bindet an die prolinreichen Domänen von Dynamin und Synaptojanin (David *et al.*, 1996; Takei *et al.*, 1999).

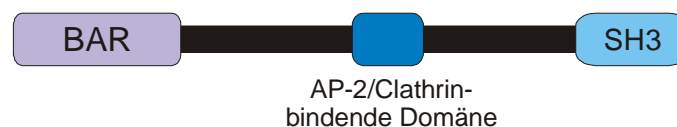


Abbildung 1-11. Amphiphysin 1. Die aminoterminalen BIN-Amphiphysin-RVS- (BAR-) Domäne vermittelt neben der Lipid-Bindung auch die Homo- und Heterodimerisierung der Amphiphysine. Mit der zentralen Region interagiert Amphiphysin 1 mit dem AP-2-Komplex, während die carboxyterminale SH3-Domäne an Dynamin und Synaptojanin bindet.

In *in vitro*-Experimenten unterbindet die isolierte SH3-Domäne von Amphiphysin die Ringformation von Dynamin, jedoch ist Amphiphysin voller Länge hierzu nicht in der Lage (Owen *et al.*, 1998; Takei *et al.*, 1999). Eine Injektion von Peptiden, die mit den SH3-Bindungspartnern von Amphiphysin konkurrieren, in große reticulo-spinale Synapsen von Neunaugen ergeben eine Blockade der Endozytose mit tief invaginierten clathrinumhüllten Membraneinstülpungen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß gereinigtes Amphiphysin zusammen mit Dynamin Liposomen zu dünnen Röhren verformt, um die es mit Dynamin dicke, spiralförmige Ringe bildet (Shupliakov *et al.*, 1997).

1.4.2.10 Endophilin

Da die Proteine der Endophilin-Familie fast zeitgleich von mehreren unabhängigen Forschungsgruppen publiziert wurden, hat sich bis heute keine der verschiedenen Bezeichnungen durchgesetzt. Zuerst wurden die Mausisoformen mittels Durchmusterung mehrerer Expressionsbanken mit charakteristischen SH3-bindenden Peptiden als SH3P4 (Endophilin 1), SH3P8 (Endophilin 3) und SH3P13 (Endophilin 2) identifiziert (Sparks *et al.*, 1996). Später wurden die humanen Endophiline durch Polymerase-Kettenreaktion mit degenerierten, zu typischen Sequenzen von SH3-Domänen komplementären Oligonukleotiden amplifiziert und als SH3GL1 (Endophilin 2) mit ubiquitärer Gewebeverteilung, SH3GL2 (Endophilin 1) mit hirnspezifischer Expression und SH3GL3 (Endophilin 3) mit auf Hirn und Testis begrenzter Expression publiziert (Giachino *et al.*, 1997). Bei Untersuchungen von akuter myeloider Leukämie wurde festgestellt, daß das humane Gen von Endophilin 2 (hier: EEN) in einem Patienten mit dem MLL-Gen, dem humanen Homolog des *trithorax*-Gens aus *Drosophila melanogaster*, fusioniert ist (So *et al.*, 1997). Endophilin 1 erhielt die Bezeichnung EEN-B1, während vier verschiedene Spleißvarianten von Endophilin 3 EEN-B2-L1 bis EEN-B2-L4 genannt wurden (So *et al.*, 2000). Die geläufigste Bezeichnung als Endophilin bezieht sich auf Interaktionen von Endophilin 1 mit verschiedenen endozytotischen Proteinen und seine zentrale Rolle bei der Endozytose von synaptischen Vesikeln (Micheva *et al.*, 1997b).



Abbildung 1-12. Endophilin. Die ca. 40 kDa großen Endophiline besitzen eine aminoterminal Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase-(LPAAT-) Domäne, die über eine Coiled-coil-Region und eine isoformspezifische Region mit der carboxyterminalen SH3-Domäne verbunden ist.

Aus der drei Mitglieder umfassenden Familie der Endophiline ist das hirnspezifisch exprimierte Endophilin 1 am besten charakterisiert worden. Über die carboxyterminale SH3-Domäne interagiert es mit Dynamin, bevorzugt jedoch mit Synaptojanin (Micheva *et al.*, 1997; Ringstad *et al.*, 1997). Die unter den Familienmitgliedern hoch konservierte ami-

noterminale Domäne bindet an Lipide und besitzt Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase-(LPAAT-) Aktivität, durch die Endophilin vermutlich mit der Umwandlung von Lysophosphatidsäure zu Phosphatidsäure die Wölbung der Lipiddoppelschicht beeinflusst (Schmidt *et al.*, 1999).

In *in vitro*-Experimenten wurde gezeigt, daß Endophilin 1 sowohl aktivierte Fettsäuren (Acyl-Coenzym A, Acyl-CoA) als auch Lysophosphatidsäure bindet und die Übertragung des Fettsäurerestes von Coenzym A auf Lysophosphatidsäure katalysiert (Schmidt *et al.*, 1999; Abbildung 1-13). Andere potentielle Substrate wie Lysophosphatidylcholin, Lysophosphatidylserin, Lysophosphatidylinositol oder Lysophosphatidylethanolamin wurden von Endophilin nicht oder nur in sehr geringen Raten umgesetzt. Ungesättigte aktivierte Fettsäuren wie Arachidonoyl-CoA förderten unter zellfreien Bedingungen die Abschnürung von clathrinumhüllten Vesikeln, während gesättigte aktivierte Fettsäuren wie Palmitoyl-CoA die Freisetzung der Vesikel inhibierten. Als Modell wird daher angenommen, daß ungesättigte Fettsäurereste die Form der entstehenden Phosphatidsäure im Vergleich zum Substrat Lysophosphatidsäure invertieren. Die kegelförmige Phosphatidsäure in der zytoplasmatischen Seite der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran erleichtert die Invasinierung der Membran, da sie einen deutlich geringeren Wölbungsradius zuläßt als Lysophosphatidsäure, die die Form eines invertierten Kegels besitzt (Schmidt *et al.*, 1999).

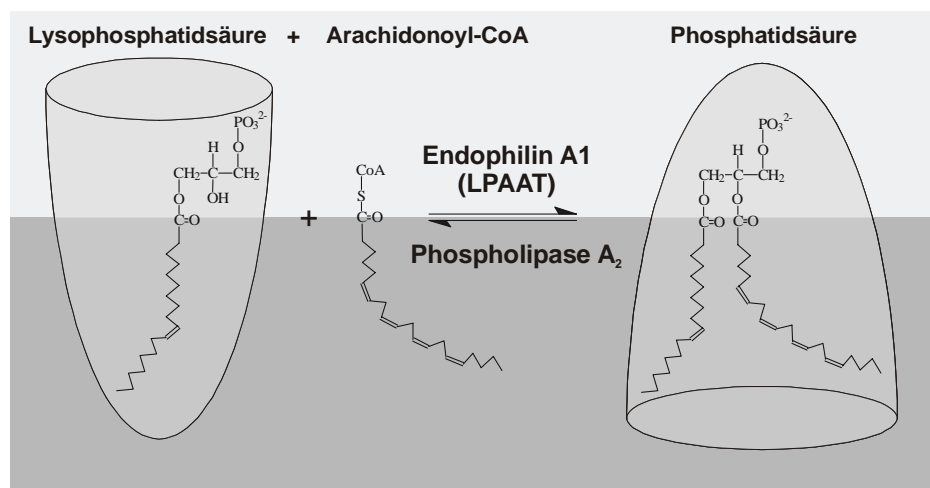


Abbildung 1-13. Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase-(LPAAT-) Aktivität von Endophilin 1. Endophilin 1 katalysiert die Synthese von Phosphatidsäure durch Übertragung von aktivierten Fettsäuren auf Lysophosphatidsäure, so daß sich deren Kegelform invertiert. Die Rückreaktion wird von Phospholipase A₂ katalysiert (nach Scales und Scheller, 1999).

Weiterhin scheint eine Phosphorylierung von Endophilin durch cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) oder Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II die LPAAT-Aktivität und Vesikelbildung zu stimulieren, während die Bindung an Dynamin über die SH3-Domäne von Endophilin für die Bildung von Vesikeln aus Donormembranen essen-

tiell ist, da eine SH3-Deletionsmutante zwar noch LPAAT-Aktivität besitzt, jedoch keinen Einfluß mehr auf die Rate der sich bildenden Vesikel hat (Schmidt *et al.*, 1999).

Endophilin scheint jedoch bei mehreren Schritten der Vesikelreifung benötigt zu werden, denn die Mikroinjektion von Antikörpern, die gegen Endophilin gerichtet sind, unterbricht den endozytotischen Prozeß in einem frühen Stadium, an dem sich eine Clathrin-Hülle über der leicht eingewölbten Membran gebildet hat (Ringstad *et al.*, 1999). Wird jedoch die carboxyterminale SH3-Domäne durch Mikroinjektion von prolinreichen Peptiden blockiert, können zusätzlich zu tief invaginierten Membraneinstülpungen auch noch clathrinumhüllte Vesikel beobachtet werden (Gad *et al.*, 2000). Dies kann mit einer gestörten Synaptojanin-Rekrutierung zu den noch clathrinumhüllten Vesikeln erklärt werden, während die unterbrochene Dynamin-Endophilin-Interaktion für die verlangsamte Vesikelabschnürung verantwortlich sein kann. Durch Mikroinjektion der rekombinant exprimierten Endophilin-SH3-Domäne wird hingegen die Abschnürung der Vesikel unterbunden (Simpson *et al.*, 1999). Es bilden sich Intermediate mit verlängerten Vesikelhälsen, die mit Dynaminringen umgeben sind und den Intermediaten nach einer GTP γ S-Injektion entsprechen.

Neben den schon beschriebenen Bindungspartnern, die ebenfalls an der Entstehung clathrinumhüllter Vesikel beteiligt sind, sind noch eine Reihe weiterer Proteine bekannt, die mit Endophilinen interagieren.

Die Bindung von Endophilin 1 an die dritte intrazelluläre Schleife des β 1-adrenergen Rezeptors beeinflusst sowohl die Internalisierung des Rezeptors nach Stimulierung als auch die Signalweiterleitung selbst (Tang *et al.*, 1999). Der β 1-adrenerge Rezeptor führt nach Ligandenbindung zur Loslösung stimulierender GTP-bindender Proteine (Gs-Proteine) von der Plasmamembran, welche daraufhin die Adenylat-Cyclase aktivieren. Die Überexpression von Endophilin 1 führt zu einer erhöhten Internalisierungsrate des Rezeptors nach Ligandenbindung, während die Bindung an Gs-Proteine leicht herabgesetzt wird. Es wird daher vermutet, daß Endophilin 1 als Adapterprotein den β 1-adrenergen Rezeptor mit endozytotischen Proteinen verbindet und so für das Rezeptorrecycling des β 1-adrenergen Rezeptors verantwortlich ist.

Für die Interaktion der membranverankerten Metalloproteasen Disintegrine MDC 9 und 15 mit Endophilin 1 wird ebenfalls vermutet, daß Endophilin 1 die Verbindung zu weiteren Proteinen der Endozytose herstellen kann und somit Recycling, intrazellulären Transport oder finale subzelluläre Verteilung der Disintegrine kontrollieren kann (Howard *et al.*, 1999).

Ein weiterer Bindungspartner von Endophilin 3, Huntingtin, ist ein 350 kDa großes Protein mit unbekannter Funktion, welches in mutierter Form die neurodegenerative Erkrankung *Chorea Huntington* (Huntington's Disease, HD) auslöst. Endophilin 3 interagiert

um so stärker mit Huntingtin, je länger die pathologisch veränderte aminoterminal Glutaminregion ist. Man geht davon aus, daß die Huntingtin-Endophilin 3-Wechselwirkung neben einer unbekannten, im Vesikeltransport vermuteten physiologischen Funktion auch eine Rolle in der Progression von *Chorea Huntington* besitzt, da es die Formation von Aggregaten aus mutiertem Huntingtin verstärkt (Sittler *et al.*, 1998).

1.4.2.11 PACSIN

PACSIN 1 und das später als Syndapin veröffentlichte Rattenhomolog sind die fast ausschließlich im Hirn exprimierten Mitglieder der aus drei Proteinen bestehenden PACSIN-Familie zytoplasmatischer Adapterproteine. PACSIN 2 weist dagegen eine ubiquitäre und PACSIN 3 eine auf Hirn, Lunge und Muskelgewebe beschränkte Expression auf (Plomann *et al.*, 1998; Qualmann *et al.*, 1999; Ritter *et al.*, 1999; Modregger *et al.*, 2000). Obwohl die genaue Funktion der PACSIN-Proteine noch weitestgehend unbekannt ist, wird vermutet, daß sie die clathrinvermittelte Endozytose mit der Reorganisation des Actin-Zytoskeletts verknüpfen (Qualmann *et al.*, 1999).

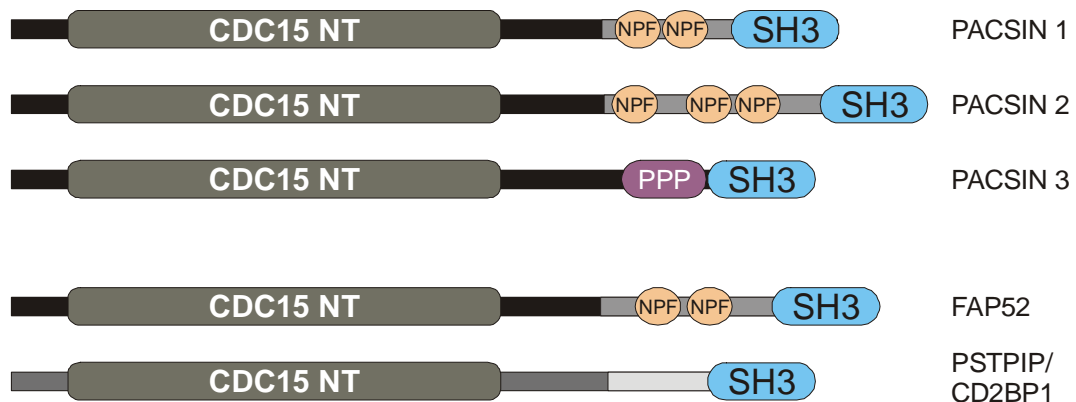


Abbildung 1-14. Proteine der PACSIN-Familie. Neben der aminoterminalen CDC15NT-Region besitzen alle Familienmitglieder carboxyterminale Protein-Protein-Interaktionsmotive wie SH3-Domänen, NPF-Motive oder prolinreiche Regionen (PPP). Die drei PACSIN-Proteine sind entfernt mit PSTPIP/CD2BP1 verwandt, das ebenfalls eine CDC15NT-Domäne und eine SH3-Domäne enthält. FAP52 stellt das in Fokalkontakten lokalisierte PACSIN2-Homolog aus *Gallus gallus* dar.

Die drei bekannten Isoformen PACSIN 1, 2 und 3 unterscheiden sich in ihrem strukturellen Aufbau nur wenig voneinander. Die aminoterminal CDC15NT-homologe Region ist über einen isoformspezifischen Bereich mit der carboxyterminalen SH3-Domäne verknüpft. In dieser isoformspezifischen Region befinden sich weitere Protein-Protein-Interaktionsmotive, im Fall von PACSIN 1 und PACSIN 2 zwei bzw. drei NPF-Aminosäuremotive, die mit EH-Domänen interagieren können, und bei PACSIN 3 eine prolinreiche Region, die Merkmale zur Bindung von SH3-Domänen erfüllt (Modregger *et al.*, 2000).

Neben Dynamin interagieren die PACSIN-Familienmitglieder über ihre SH3-Domäne auch mit Proteinen wie Synaptojanin, Synapsin und dem neuronalen Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (N-WASP), die sowohl an der Endozytose synaptischer Vesikel als auch an der Regulierung des Actin-Zytoskeletts beteiligt sind (Qualmann *et al.*, 1999; Modregger *et al.*, 2000). Synaptojanin hydrolysiert vermutlich auch solches Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, das an actinregulierende Proteine gebunden ist, während N-WASP actinpolymerisierende Eigenschaften zeigt. Synapsin schließlich ist an der Bündelung einzelner Actinfasern in Synapsen beteiligt. Die Interaktion mit der prolinreichen Domäne von Dynamin rekrutiert PACSIN vermutlich zu den sich abschnürenden Vesikeln. Diese Interaktionen von Syndapin/PACSIN mit Proteinen, die an der Reorganisation des Actin-Zytoskeletts beteiligt sind, und endozytotischen Proteinen lassen mehrere Interpretationen zu (Qualmann und Kelly, 2000; Qualmann *et al.*, 2000). Zum einen könnte das von PACSIN beeinflusste Actin-Zytoskelett an der strukturellen Organisation der endozytotischen Proteinkomplexe an sogenannten „hot spots of endocytosis“ beteiligt sein, wie sie in *Drosophila melanogaster* Synapsen beobachtet wurden (Estes *et al.*, 1996; Gonzalez-Gaitan und Jackle, 1997; Roos und Kelly, 1998). Weiterhin könnte eine durch PACSIN kontrollierte Actin-Polymerisation die Bewegung der neu gebildeten Vesikel in das Zytosol antreiben (Frischknecht *et al.*, 1999; Merrifield *et al.*, 1999).

Wird PACSIN in Zellen überexprimiert, so blockiert es die Aufnahme von Transferrin durch rezeptorvermittelte Endozytose in clathrinumhüllten Vesikeln in Abhängigkeit von der exprimierten Proteinmenge. Der Effekt ist eindeutig den SH3-Interaktionen von PACSIN zuzuordnen, da die Überexpression einer Mutante von PACSIN mit inaktivierter SH3-Domäne nicht zu einer Inhibition der Endozytose des Transferrinrezeptors führt (Modregger *et al.*, 2000).

In vitro-Untersuchungen mit rekombinant exprimierten SH3-Domänen des Rattenhomologs von PACSIN, Syndapin, zeigen, daß es während der Endozytose die finale Abschnürung der Vesikel blockiert, nicht jedoch die Formation der clathrinumhüllten Invaginationen als Zwischenschritt. Da der gleiche Effekt mit SH3-Domänen von Amphiphysin II und Intersectin erzielt werden konnte, wird vermutlich die Funktion von Dynamin, dem gemeinsamen Bindungspartner aller drei Proteine, beeinträchtigt (Simpson *et al.*, 1999).

Das nicht näher untersuchte Homolog von PACSIN 2 in *Gallus gallus*, FAP52, wird als Phosphoprotein in Fokalkontakten beschrieben, ohne jedoch genauer auf die Funktion des Proteins einzugehen. Möglicherweise ist es in den Fokalkontakten für die Endozytose von Integrinrezeptoren verantwortlich, die dort die Verbindung zwischen Zytoskelett und extrazellulärer Matrix herstellen und für Adhäsion, Migration und Differenzierung der Zellen verantwortlich sind (Meriläinen *et al.*, 1997). Desweiteren interagiert humanes PACSIN 2 mit dem Disintegrin MDC15 (Howard *et al.*, 1999), während *Xenopus*

PACSIN 2 an Disintegrin ADAM13 bindet und dessen Aktivität zu regulieren scheint (Cousin *et al.*, 2000).

Das am besten charakterisierte Mitglied der CDC15NT-Superfamilie ist das nur entfernt mit PACSIN verwandte *cdc15p* aus *Schizosaccharomyces pombe*, welches an der Zytoskelett-Reorganisation während der Zytokinese beteiligt ist. In *cdc15p*-defizienten Mutanten ist der Aufbau der Actin-Wand während der Zellteilung unterbunden, das eigentliche Wachstum und die Teilung des Zellkerns ist jedoch nicht betroffen, so daß sich multinukleäre Zellen ausbilden (Fankhauser *et al.*, 1995; Spencer *et al.*, 1997). Das Hefeprotein *cdc15p* entspricht den Säugerproteinen PSTPIP (PEST phosphatase interacting protein; Wu *et al.*, 1998) bzw. CD2BP (CD2-bindendes Protein; Li *et al.*, 1998).

1.4.3 Interaktionen der endozytotischen Proteine

Da noch nicht alle exakten Funktionen der beteiligten Proteine aufgeklärt worden sind, kommt eine besondere Bedeutung den Protein-Protein-Interaktionen der endozytotischen Proteine zu. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Gesamtheit der Interaktionen dieser Proteine untereinander betrachtet (Abbildung 1-15).

Wie sich anhand von *in vitro*-Analysen gezeigt hat, sind viele der für die Wechselwirkungen verantwortlichen Motive und Domänen in der Lage, mit mehreren Bindungspartnern zu interagieren, und einige der Proteine können zusätzlich oligomerisieren, so daß sich größere Proteinkomplexe ergeben. Es wurde daher in neueren Analysen häufig auch die zeitliche Abfolge der Interaktionen untersucht, denn wie sich an Endophilin 1 zeigt, können die beteiligten Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten verschiedene Funktionen ausüben. In der frühen Phase der Membraninvagination scheint Endophilin 1 mit der Umwandlung von Lysophosphatidsäure zu Phosphatidsäure die Membrankrümmung zu beeinflussen, während es nach der Abschnürung der Vesikel für die Entfernung der Clathrin-Hülle mitverantwortlich sein könnte. Für beide Funktionen ist die SH3-Domäne von Endophilin 1 mit ihren Interaktionen zu Amphiphysin, Dynamin und Synaptojanin unbedingt erforderlich.

Viele der endozytotischen Proteine interagieren jedoch auch direkt mit der Plasma- oder Vesikelmembran. Neben den Adapterproteinen AP-2 und AP-180 binden die lipidverändernden Enzyme Synaptojanin 1 und Endophilin 1 direkt an die Membranen. Andere Komponenten der endozytotischen Komplexe wie Dynamin und Amphiphysin werden über ihre membranbindenden Domänen (Dynamin: PH-Domäne, Amphiphysin: BAR-Domäne) zu den endozytotischen Stellen rekrutiert.

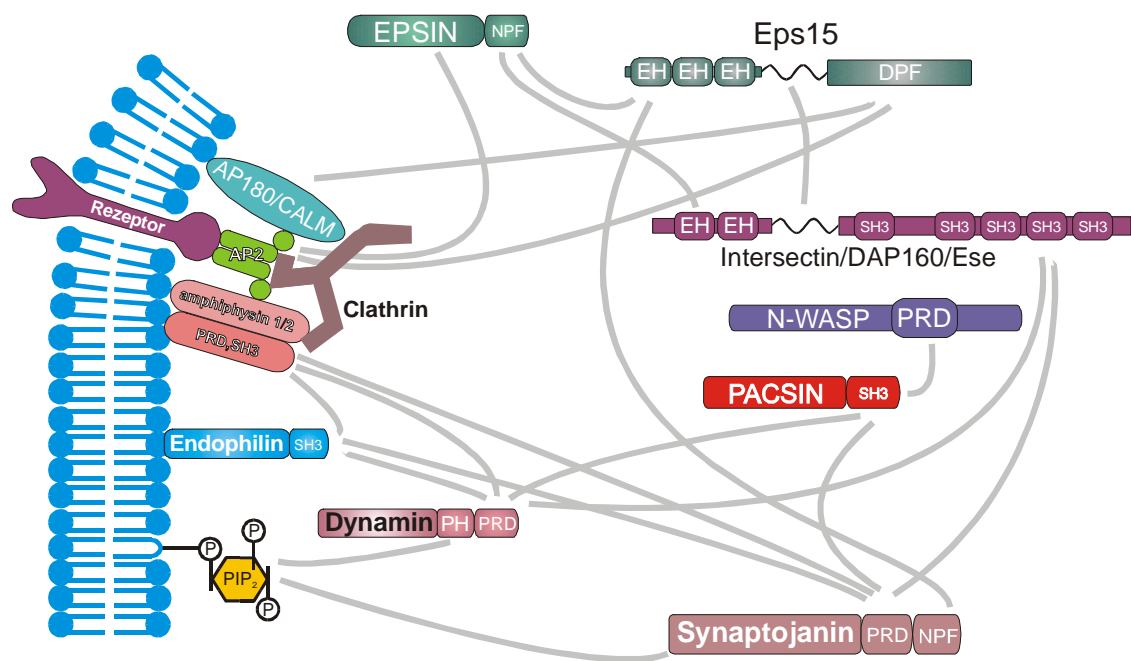


Abbildung 1-15. Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen der endozytotischen Proteine. Graue Linien markieren bisher bekannte Interaktionen.

Neben den gut charakterisierten Proteinen wie z. B. Dynamin sind die Funktionen von anderen Proteinen noch unklar. Insbesondere PACSIN, das mit Dynamin, Synaptojanin und N-WASP interagiert und damit vermutlich eher in einer späteren Phase der Vesikelbildung zum Einsatz kommt, könnte eine wichtige Funktion bei der Verknüpfung von Endozytose mit einer einhergehenden Zytoskelett-Reorganisation ausüben.

2 Eigene Vorarbeiten

Zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeiten waren weder die Funktion von PACSIN 1 charakterisiert noch die Bindungspartner identifiziert. Da PACSIN 1 für Protein-Protein-Wechselwirkungen bekannte NPF-Motive und eine SH3-Domäne besitzt, wurde ein Two-Hybrid-Screen mit PACSIN 1 als „bait“ durchgeführt.

Die für PACSIN 1 kodierende cDNA wurde in den Hefe-Expressionsvektor pAS2-1 kloniert und nach Kontrollsequenzierung mit den Plasmiden der Two-Hybrid-Expressions-cDNA-Bank in Y190 Hefen transformiert. Miteinander interagierende GAL4-Fusionsproteine aktivieren die enthaltenen HIS- und LacZ-Reportergene, so daß aus $1,0 \times 10^6$ in der cDNA-Bank vorhandenen Klonen nach verschiedenen Selektionsdurchgängen die cDNA von 11 verschiedenen potentiellen Interaktionspartnern von PACSIN 1 isoliert werden konnte (Modregger, 1997).

Klon	Identität
2-10	Neural Visinin like Protein 3 (NVP-3)
4-12	unbekannt
6-15, 16-1, 16-3, 32-8	unbekannt
11-1	unbekannt
18-1, 19-1, 39-9	unbekannt, besitzt prolinreiche Regionen
26-14	unbekannt, neue PAST-Isoform, besitzt EH-Domäne
31-7	Statin S1
42-14	P140, besitzt prolinreiche Regionen
47-9	Kinectin
48-9	unbekannt, neue Endophilin-Isoform, besitzt prolinreiche Regionen
50-9	unbekannt

Tabelle 2-1. Ergebnisse des PACSIN 1-Two-Hybrid-„Screens“. Nach Durchführung aller Kontrollen wurden 11 verschiedene Bindungspartner von PACSIN 1 identifiziert und die zugehörige cDNA sequenziert. Zwei Bindungspartner, 6-15 und 18-1 wurden mehrfach isoliert.

Zur Kontrolle der Interaktion wurden sämtliche Klone aus dem Plasmid pACT2 in das Plasmid pAS2-1 umkloniert, um durch erneute Kotransformation mit pACT2/PACSIN 1 die Bindung in der umgekehrten Richtung zu verifizieren. Anschließend wurden die Sequenzen der Klone analysiert.

Das neuronale Visinin-ähnliche Protein NVP-3 bindet mit seinen 16 carboxyterminalen Aminosäuren an PACSIN 1 und ist über seine drei funktionellen Ca^{2+} -bindenden EF-Hände vermutlich wie andere Mitglieder der VILIP-Familie in Ca^{2+} -abhängige Signalkaskaden involviert (Kajimoto *et al.*, 1993). Kinectin als vesikelgebundener Rezeptor des Motorproteins Kinesin ist am anterograden Vesikeltransport beteiligt (Toyoshima *et al.*, 1992; Burkhardt, 1996). Klon 26-14 besitzt Homologie zu *Drosophila melanogaster* PAST-1, einem Protein mit einer ATP/GTP-Bindungsstelle und einer carboxyterminalen EH-Domäne (Genbank Zugriffsnummer: U70135). Klon 31-7 beinhaltet die cDNA von Statin (Lee *et al.*, 1992), wird jedoch in dem isolierten Two-Hybrid-Vektor nicht im Statin-Leseraster translatiert.

Die meisten der potentiellen Bindungspartner waren jedoch unbekannt und nur zum Teil als „Expressed-Sequence-Tag“- (EST-) Klone in Gendatenbanken vorhanden, so daß die neuen Bindungspartner von PACSIN 1 viele Fragen zur Funktion der Interaktion mit PACSIN 1 offen ließen.

3 Aufgabenstellung

Da zu Beginn der Arbeiten noch nicht bekannt war, daß die Proteine der PACSIN-Familie eine Rolle in der clathrinvermittelten Endozytose spielen, sollten die in einem Two-Hybrid-Screen identifizierten Bindungspartner von PACSIN 1 näher charakterisiert werden, um so weitere Hinweise auf die Funktion von PACSIN 1 zu gewinnen. Aufgrund der Bindungspartner wurde vermutet, daß PACSIN 1 an der Vesikelbildung oder am Vesikeltransport teilnehmen könnte, da Kinectin als vesikelassoziiertes Protein (Kumar *et al.*, 1995) und die Endophiline als direkt an der Vesikelabschnürung beteiligte Proteine bekannt waren (Ringstad *et al.*, 1997; Micheva *et al.*, 1997).

Im ersten Schritt sollten daher die Bindungsmotive auf PACSIN 1 eingegrenzt werden, um die Interaktionen mit den Two-Hybrid-Bindungspartnern später sowohl durch Punktmutationen als auch durch proteinchemische Methoden verifizieren zu können. Interessante PACSIN 1-Interaktionen sollten dann weiter charakterisiert werden, um einen genaueren Einblick in die potentielle Beteiligung an Vesikelbildung und Transport zu erhalten.

Um weitere Bindungspartner von PACSIN 1 zu identifizieren, sollten zusätzlich proteinchemische Methoden eingesetzt werden, da das auf genetischen Methoden basierende Two-Hybrid-System teilweise bestimmte Interaktionen nicht erfassen kann, die beispielsweise auf posttranslationalen Modifikationen beruhen.

Durch die Etablierung eines quantifizierbaren Endozytose-Tests sollte die Funktion von PACSIN 1 in der Endozytose und im Vesikeltransport überprüft werden, da die bestehenden *in vivo*-Methoden zum Nachweis der clathrinvermittelten Endozytose des Transferin-Rezeptors keine verlässliche Auswertung erlauben.

4 Ergebnisse

4.1 Bindungspartner von PACSIN 1

4.1.1 Lokalisierung der Bindungsmotive

Aufbauend auf den Two-Hybrid-Untersuchungen zu PACSIN 1 (Modregger, 1997) wurden die genauen Bindungsstellen der neuen, bisher unbekannten Bindungspartner von PACSIN 1 analysiert. Zur genaueren Charakterisierung von Bindungsstellen können Deletionsmutanten der beteiligten Proteine zur gröberen Lokalisierung eingesetzt werden, während genauere Analysen mit Hilfe von Punktmutanten durchgeführt werden, um beteiligte Aminosäuren zu identifizieren.

4.1.1.1 Generierung von PACSIN 1-Deletionsmutanten

Ausgehend von der Domänenstruktur und Aminosäuresequenz von PACSIN 1 wurden die in Abbildung 4-1 aufgeführten Deletionsmutanten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) generiert, um genauere Bindungsstudien durchzuführen. Hierzu wurde die PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden P1dSH3, P1dNPF2, P1dNPF1, P1d26, P1d14-3-3 und P1sATGNcoI und der PACSIN 1-cDNA in dem Plasmid pAS2-1 als Matrize durchgeführt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden in das Plasmid pCRII kloniert und sequenziert. Anschließend wurden die Fragmente in den Two-Hybrid-Hefe-Expressionsvektor pAS2-1 kloniert und das korrekte Leseraster durch Sequenzieren überprüft.

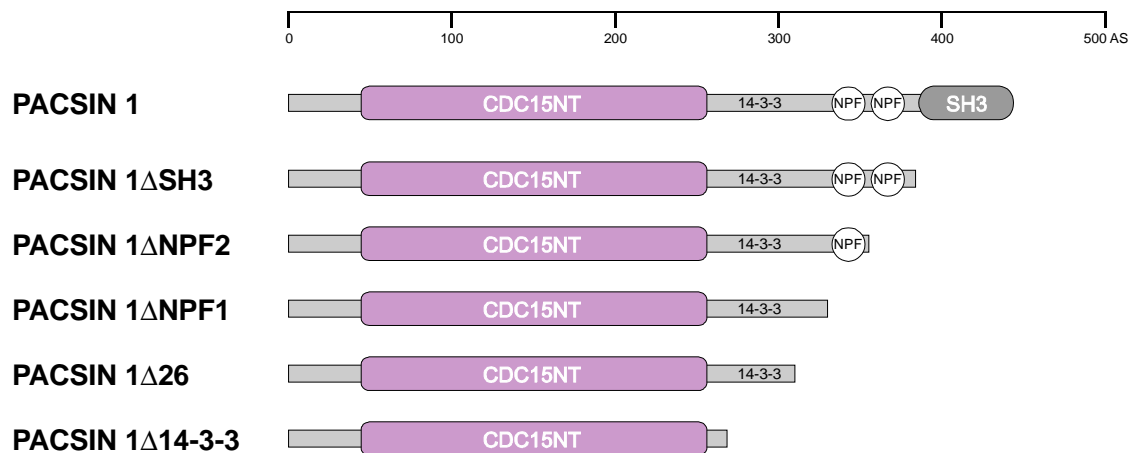


Abbildung 4-1. Deletionsmutanten von PACSIN 1. Das 441 Aminosäuren lange PACSIN 1 wurde vom carboxyterminalen Ende her um die potentiellen Protein-Protein-Interaktionsmotive SH3-Domäne, NPF-Motive und 14-3-3-Bindungsstelle verkürzt.

Die längste Deletionsmutante, PACSIN 1ΔSH3 (Aminosäuren 1-391) ist nur um die SH3-Domäne verkürzt und kann daher nicht mehr mit prolinreichen Motiven interagieren. Die NPF-Deletionsmutanten (AS 1-374, 1-363) dienen der Analyse von potentiellen Interaktionen von PACSIN 1 mit EH-Domänen. Insbesondere kann untersucht werden, ob beide NPF-Motive für die vermutete Interaktion mit EH-Domänen benötigt werden. PACSIN 1Δ26 (AS 1-337) ist gegenüber der längeren PACSIN 1ΔNPF1-Mutante um 26 Aminosäuren verkürzt, so daß das potentielle 14-3-3-Bindungsmotiv gerade noch enthalten ist. Die kürzeste PACSIN 1-Deletionsmutante (AS 1-284) endet vor der potentiellen 14-3-3-Bindungsstelle und stellt die aminoterminalen CDC15NT-homologen Region dar.

4.1.1.2 Two-Hybrid-Analysen mit PACSIN 1-Deletionsmutanten

Die zuvor beschriebenen Deletionsmutanten von PACSIN 1 wurden mit den Two-Hybrid-Interaktionspartnern von PACSIN in Y190 Hefen kotransformiert und auf Selektionsmedien ausgebracht. Nach drei bis fünf Tagen Inkubationszeit bei 30°C wurde das Wachstum und die β -Galaktosidase-Aktivität analysiert.

Klon	PACSIN 1					
	wt	Δ SH3	Δ NPF2	Δ NPF1	Δ 26	Δ 14-3-3
2-10	+	+	+	+	+	+
4-12	+	+	+	+	+	+
6-15	+	+	+	+	+	+
11-1	+	+	+	+	+	+
18-1	++	-	-	-	-	-
26-14	+	+	-	-	-	-
31-7	+	+	+	+	+	+
42-14	+	-	-	-	-	-
47-9	++	+	+	+	+	+
48-9	++	-	-	-	-	-
50-9	+	+	+	+	+	+

Tabelle 4-1. Ergebnisse der Two-Hybrid-Analysen mit PACSIN 1-Deletionsmutanten. Die Klone 2-10, 4-12, 6-15, 11-1, 31-7, 47-9 und 50-9 interagieren selbst mit der kürzesten Deletionmutante. Die Klone 18-1, 42-14 und 48-9 binden an die SH3-Domäne, Klon 26-14 an die NPF-Motive (wt, Wildtyp; ++, starkes Wachstum, Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test nach 2-4 h; +, schwächeres Wachstum, Blaufärbung nach 8 h; -, kein oder nur geringes Wachstum, keine Blaufärbung nach 8 h).

4.1.1.3 Generierung von PACSIN 1-Punktmutanten

Um sicherzustellen, daß die Ergebnisse der Bindungsstudien der Two-Hybrid-Klone mit den PACSIN 1-Deletionsmutanten nicht auf strukturelle Einflüsse der Deletionen zurückzuführen sind, wurden Punktmutationen in PACSIN 1 eingeführt, die die SH3-Domäne und die NPF-Motive inaktivieren (Abbildung 4-2).

Mit Hilfe der gerichteten Mutagenese wurden in der cDNA-Sequenz von PACSIN 1 Basenaustausche so vorgenommen und durch Sequenzierung kontrolliert, daß in der SH3-Domäne von PACSIN 1 Prolin 434 zu Leucin (PACSIN 1 P434L, Abbildung 4-2) mutiert ist, da diese Aminosäure für die Interaktion mit prolinreichen Motiven essentiell ist (Clark *et al.*, 1992). Zwei weitere Mutationen, auf die hier nicht näher eingegangen wird, betreffen Tyrosin 391, da dieses konservierte Aminosäuremotiv in dem entfernten PACSIN-Verwandten PSTPIP durch die Kinase Src phosphoryliert wird und die Bindung von PSTPIP an WASP beeinflußt (Wu *et al.*, 1998). PACSIN 1 wird ebenfalls phosphoryliert (Plomann *et al.*, 1998), daher wurde Tyrosin 391 entweder zu Phenylalanin, das nicht mehr phosphoryliert werden kann und somit eine konstitutiv aktive SH3-Domäne darstellt, oder zu Glutaminsäure mutiert, das den phosphorylierten Zustand simuliert und somit die Bindung der SH3-Domäne an prolinreiche Motive unterbindet. Die Ergebnisse

der Two-Hybrid-Analysen der Y391F-Mutante entsprachen denen des Wildtyp-PACSIN 1, die der Y391E-Mutante denen der P434L-Mutante.

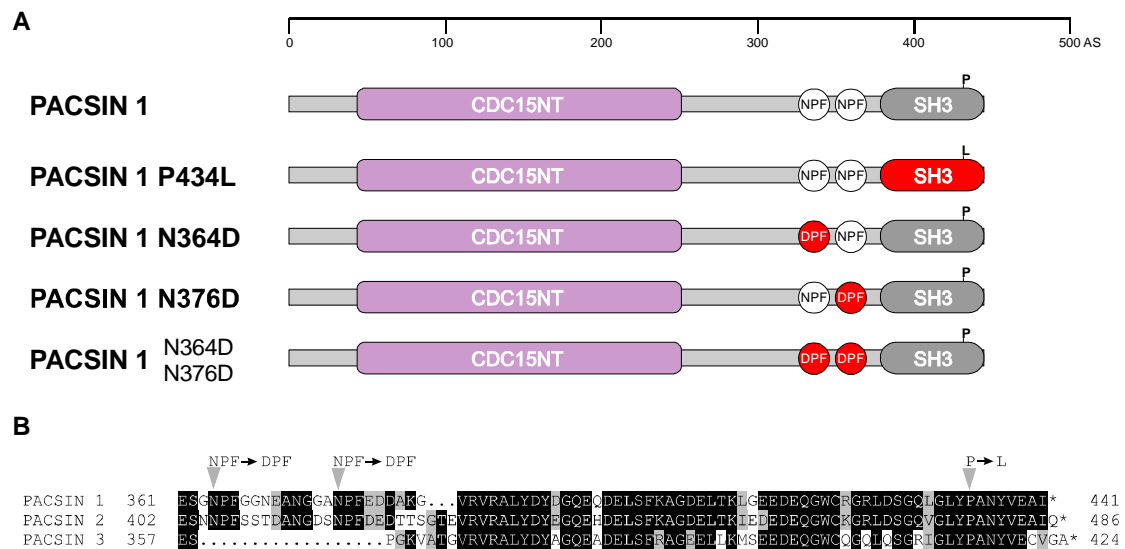


Abbildung 4-2. Punktmutationen in PACSIN 1. Die carboxyterminale SH3-Domäne wird durch die P434L-Mutation, die zwei NPF-Motive als N364D, N376D und als N364D/N376D-Doppelmutante inaktiviert (A). Im Sequenzvergleich der carboxyterminalen Regionen von PACSIN 1, 2 und 3 sind die konservierten NPF-Motive und das konservierte Prolin der SH3-Domänen mit ihren jeweiligen Aminosäureaustauschen aufgeführt (B).

Zur Inaktivierung der potentiell an EH-Domänen bindenden NPF-Motive wurden Asparagin 364 bzw. Asparagin 376 zu Asparaginsäure mutiert (Abbildung 4-2). Die hiermit verbundene Invertierung der Ladung der Aminosäure kann die Bindung an EH-Domänen verhindern (PACSIN 1 N364D, PACSIN 1 N376D, PACSIN 1 N364D/N376D; de Beer *et al.*, 2000).

4.1.1.4 Two-Hybrid-Analysen mit PACSIN 1-Punktmutanten

Zur weiteren Analyse der SH3- und NPF-bindenden Klone wurden diese mit den entsprechenden PACSIN 1-Punktmutanten im Two-Hybrid-System analysiert.

Hierzu wurden die PACSIN 1-Punktmutanten in den Hefe-Expressionsvektor pAS2-1 in das Leseraster der Gal4-DNA-bindenden Domäne kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Anschließend wurden die Punktmutanten in pAS2-1 mit den SH3- und NPF-bindenden Klonen im Expressionsvektor pACT2 in Y190 Hefen kotransformiert und auf Selektionsmedien ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von drei bis fünf Tagen wurde sowohl das Wachstum als auch die β -Galaktosidase-Aktivität ausgewertet (Tabelle 4-2).

Klon	PACSIN 1				
	wt	N364D	N376D	N364D N376D	P434L
2-10	+	+	+	+	+
4-12	+	+	+	+	+
6-15	+	+	+	+	+
11-1	+	+	+	+	+
18-1	++	++	++	++	-
26-14	+	-	-	-	+
31-7	+	+	+	+	+
42-14	+	+	+	+	+
47-9	++	+	+	+	+
48-9	++	++	++	++	-
50-9	+	+	+	+	+

Tabelle 4-2. Ergebnisse der Two-Hybrid-Analysen mit PACSIN 1-Punktmutanten. Die Bindung der Klone 18-1, 42-14 und 48-9 an die PACSIN 1-SH3-Domäne wird durch die P434L-Mutation verhindert. Sowohl Einzel- als auch Doppel-NPF-Mutanten inhibieren die Interaktion von Klon 26-14 mit PACSIN 1 (wt, Wildtyp; ++, starkes Wachstum, Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test nach 2-4 h; +, schwächeres Wachstum, Blaufärbung nach 8 h; -, kein oder nur geringes Wachstum, keine Blaufärbung nach 8 h).

Die Ergebnisse der Two-Hybrid-Analysen der PACSIN 1-Deletionsmutanten in Tabelle 4-1 wurden vollständig durch die Punktmutanten bestätigt (Tabelle 4-2). Für Klon 26-14 zeigte sich, daß für die Interaktion auf PACSIN 1-Seite beide NPF-Motive vorhanden sein müssen. Weder NPF1 (AS 364-366) noch NPF2 (AS 376-378) allein waren für eine Bindung ausreichend, die vermutlich über die EH-Domäne von Klon 26-14 vermittelt wird. Die Interaktion aller drei prolinreichen SH3-bindenden Two-Hybrid-Klone mit PACSIN 1 ließ sich durch die Mutation P434L unterbinden.

4.1.2 Bindungsspezifität an PACSIN-Isoformen

Da die SH3-Domänen der PACSIN-Isoformen PACSIN 1, PACSIN 2 und PACSIN 3 hoch konserviert sind (Modregger *et al.*, 2000, siehe auch Abbildung 4-2B), ist die Spezifität der Interaktionen der PACSIN 1-Bindungspartner von Interesse.

Zur weiteren Charakterisierung der Isoform-Spezifität wurden die Bindungspartner 18-1, 42-14 und 48-9 mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems gegen PACSIN 2 und 3 getestet. Hierzu wurde die cDNA von PACSIN 2 und 3 in das Leseraster der Gal4-DNA-bindenden

den Domäne des Expressionsvektors pAS2-1 kloniert (Modregger *et al.*, 2000). Die pACT2-Konstrukte von 18-1, 42-14 und 48-9 wurden mit den entsprechenden pAS2-1/PACSIN-Konstrukten in Y190 Hefen kotransformiert und die Aktivierung der Reportergene nach fünf Tagen analysiert.

pAS2-1	18-1	pACT2 42-14	48-9
PACSIN 1	++	+	++
PACSIN 2	++	+	++
PACSIN 3	++	+	++

Tabelle 4-3. Two-Hybrid-Interaktionen der PACSIN 1-SH3-Bindungspartner mit PACSIN 2 und PACSIN 3. Die Two-Hybrid-Expressionsvektoren pAS2-1 und pACT2 mit inserierten cDNAs von PACSIN 1, 2 und 3 bzw. Klon 18-1, 42-14 und 48-9 wurden in Y190 Hefen kotransformiert und nach 5 Tagen die Aktivierung der Reportergene analysiert (++, starkes Wachstum, Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test nach 2-4 h; +, schwächeres Wachstum, Blaufärbung nach 8 h).

Die mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems isolierten PACSIN 1-SH3-bindenden Klone 18-1, 42-14 und 48-9 interagierten auch mit PACSIN 2 und PACSIN 3, wie es aufgrund der konservierten SH3-Domänen der PACSIN-Familie zu erwarten war (Tabelle 4-3). Alle weiteren bekannten Interaktionen mit Dynamin, Synaptojanin oder N-WASP sind ebenfalls gemeinsame Bindungspartner aller PACSIN-Proteine (Modregger *et al.*, 2000).

4.1.3 Zusammenfassung der Two-Hybrid-Interaktionsstudien

PACSIN 1 als hirnspezifisches Adapterprotein bindet nicht nur mit seinen bekannten Protein-Protein-Interaktionsmotiven, der carboxyterminalen SH3-Domäne und den NPF-Motiven an verschiedene Proteine. Die kürzeste Deletionsmutante von PACSIN 1, die nur noch die aminoterminalen 284 Aminosäuren umfaßt, interagiert noch mit fünf der Two-Hybrid-Bindungspartner, so daß sich vermutlich in der CDC15NT-Region weitere Protein-Protein-Interaktionsmotive befinden.

Genauere Sequenzanalysen der Two-Hybrid-Interaktionspartner von PACSIN 1 ergaben, daß der Klon 31-7 (Statin) im Two-Hybrid-System nicht im Statin-Leseraster translatiert wird, so daß diese Interaktion *in vivo* nicht auftreten wird. Klon 50-9 besitzt eine poly(A)-Sequenz nur 52 Basenpaare nach Beginn des Klonen, hat aber insgesamt eine Größe von ca. 900 Basenpaaren. In diesem Fall wurden vermutlich zwei cDNAs bei der Konstruktion der Two-Hybrid-cDNA-Bank aneinanderligiert, so daß die zweite cDNA in falscher Orientierung in das Plasmid pACT2 kloniert wurde. Die Interaktion mit Klon 50-9 wird daher *in vivo* sehr wahrscheinlich nicht auftreten.

Durch Two-Hybrid-Bindungsstudien wurden die carboxyterminalen Protein-Protein-Bindungsmotive von PACSIN 1 näher charakterisiert. Es zeigte sich, daß die beiden NPF-Motive für die Interaktion mit Klon 26-14, einem neuen PAST-Familienmitglied, notwendig sind. Dieser Klon enthält eine EH-Domäne, welche für Interaktionen mit NPF-Motiven bekannt ist.

Über die SH3-Domäne interagiert PACSIN 1 nicht nur wie bisher bekannt mit den synaptischen Proteinen Dynamin 1, Synaptojanin 1 und Synapsin sowie N-WASP, einem Actin-Zytoskelett-regulierenden Protein, sondern auch mit weiteren Proteinen wie P140 (Two-Hybrid-Klon 42-14) sowie bisher unbekannten Proteinen (Two-Hybrid-Klone 18-1 und 48-9).

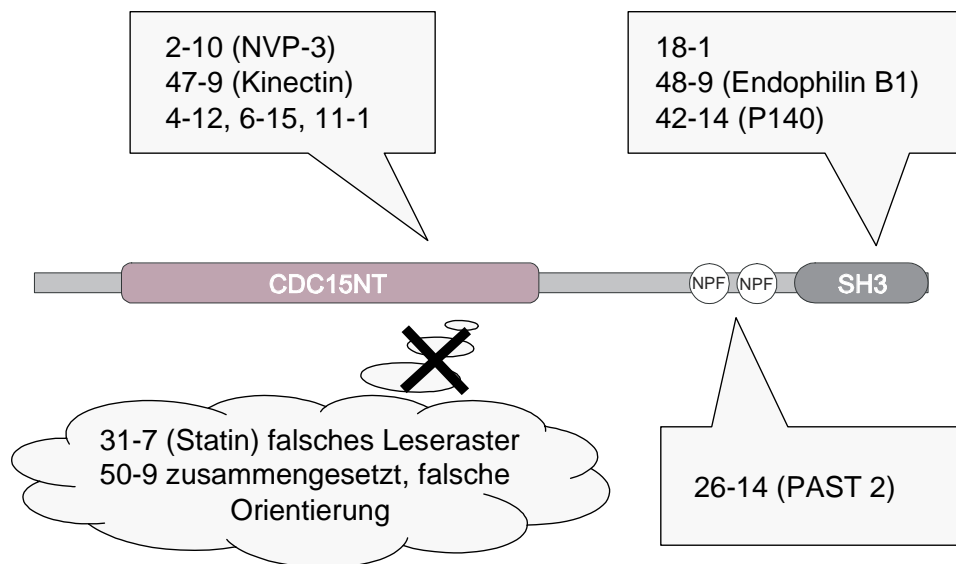


Abbildung 4-3. PACSIN 1-Two-Hybrid-Interaktionen. Mit Hilfe von Two-Hybrid-Analysen wurden die Bindungsregionen in PACSIN 1 genauer eingegrenzt. Die stark SH3-bindenden Klone 18-1, 48-9 und der nur schwach bindende Klon 42-14 weisen prolinreiche Regionen auf, die zur Bindung an SH3-Domänen benötigt werden. Klon 26-14 benötigt beide NPF-Motive zur Interaktion mit PACSIN 1 während die Bindungsstellen der weiteren Two-Hybrid-Klone im aminoterminalen Bereich von PACSIN 1 liegen. Die Klone 31-7 und 50-9 werden im Two-Hybrid-System als PACSIN 1-bindend identifiziert, scheinen jedoch aufgrund von Sequenzanalysen *in vivo* nicht mit PACSIN 1 zu interagieren.

Da SH3-Domänen und ihre Interaktionen in vielen zellulären Prozessen wie Signaltransduktion, Zellbewegung, Regulation von Enzymen sowie der Transkriptionskontrolle eine entscheidende Rolle einnehmen, fokussieren sich die weiteren Analysen auf die neu identifizierten SH3-Bindungspartner von PACSIN 1.

Der Two-Hybrid-Klon 18-1 war für weitere Untersuchungen besonders interessant, da dieser Klon sehr stark mit PACSIN 1 interagierte, jedoch auch in Lage war, im Two-Hybrid-System mit den anderen PACSIN-Isoformen die Reportergene zu aktivieren.

Zusätzlich gab es zu Klon 18-1 noch keine Genbank-Einträge, so daß es sich sehr wahrscheinlich um ein sehr seltenes Transkript handelt. Klon 48-9 weist große Ähnlichkeit zu den Endophilinen auf, die wie PACSIN 1 ebenfalls an endozytotischen Prozessen beteiligt sind. Dieser Klon könnte daher zum weiteren Verständnis der Abschnürung von Vesikeln beitragen.

Durch die Möglichkeit zur Homo- und Hetero-Oligomerisierung der PACSIN-Proteine ergibt sich zusätzlich die Möglichkeit, daß PACSIN 1 mit mehreren Bindungspartnern in größeren Komplexen vorkommt (Modregger *et al.*, 2000).

4.2 Charakterisierung des Klons 18-1

Da das Two-Hybrid-System auf der artifiziellen Expression von Fusionsproteinen in den Nukleus von Hefezellen beruht, birgt es die Gefahr, Interaktionen zu detektieren, die *in vivo* nicht auftreten (Fields und Sternglanz, 1994).

Um vor der weiteren Analyse sicherzustellen, daß die PACSIN 1-18-1-Interaktion nicht nur im Two-Hybrid-System nachzuweisen ist, sollte daher die Interaktion mit proteinchemischen Methoden bestätigt werden.

4.2.1 Verifikation der PACSIN 1-Klon 18-1-Interaktion

Für die Kontrolle der PACSIN 1-Klon 18-1-Interaktion auf Proteinebene sollte 18-1-Protein mit rekombinant exprimierten GST-PACSIN 1-Fusionsproteinen präzipitiert werden („Pull down“).

Hierzu wurden die cDNA des Two-Hybrid-Klons 18-1 in das Leseraster des HämAgglutinin-(HA-) tags im Expressionsvektor pHA-CMV und die cDNA-Varianten PACSIN 1 voller Länge, PACSIN 1 mit der P434L-Punktmutation (Abbildung 4-2), PACSIN 1 Δ SH3 (AS 1-385) und SH3^{PACSIN 1} (AS 386-441) in das Plasmid pGEX-3X kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Die mit Hilfe der pGEX-3X-Konstrukte rekombinant exprimierten GST-PACSIN 1-Fusionsproteine wurden aufgereinigt und an Glutathion-Sepharose 4B immobilisiert. Diese Matrices wurden über Nacht mit Zellextrakten aus NIH 3T3 Fibroblasten inkubiert, welche zuvor mit den Vektoren zur Expression von HA-18-1-Fusionsprotein transfiziert worden waren. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit PBS, 0,01 % Triton X-100 von den Matrices gewaschen und spezifisch gebundene Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Im Western Blot wurde mit HA-tag-spezifischen Antikörpern nachgewiesen, daß Klon 18-1 neben PACSIN 1 voller Länge auch spezifisch durch die SH3-Domäne von PACSIN 1 präzipitiert wurde (Abbildung 4-4). HA-18-1 interagierte weder mit der um

die SH3-Domäne verkürzten Deletionsmutante, noch mit der die SH3-Domäne inaktivierenden P434L-Punktmutante.

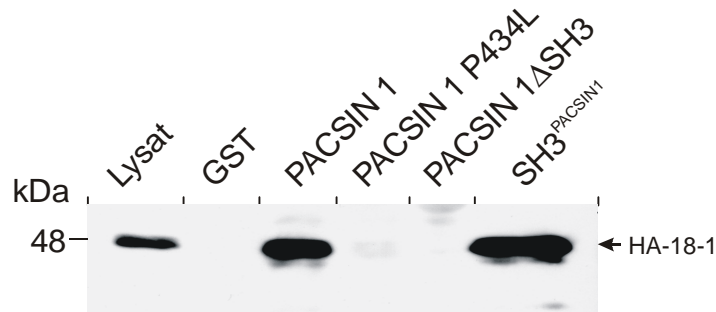


Abbildung 4-4. Präzipitation von 18-1 mit immobilisiertem PACSIN 1. HA-18-1-Fusionsprotein wurde in NIH 3T3 Fibroblasten überexprimiert und HA-18-1 aus den Zellysaten spezifisch mit GST-Fusionsproteinen von PACSIN 1 voller Länge und der PACSIN 1-SH3-Domäne in einem „Pull down“-Experiment präzipitiert. An die immobilisierten GST-PACSIN 1-Fusionsproteine gebundene Proteine wurden mittels Western Blot analysiert und mit HA-tag-spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

4.2.2 Sequenzanalyse von Klon 18-1

Um vor der Sequenzanalyse sicherzugehen, daß von Klon 18-1 die vollständige cDNA-Sequenz vorhanden war, wurde eine Maus-cDNA-Bank mit Hilfe einer radioaktiv markierten 18-1-spezifischen Sonde (entsprechend der Nukleotide 338-2309) nach homologen Sequenzen durchmustert. Die zu Klon 18-1 homologen Klone wurden durch Restriktionsanalysen und PCR charakterisiert und die längsten Klone vollständig sequenziert.

Die gesamte Länge der zu Klon 18-1 gehörigen cDNA beträgt 2309 Basenpaare, die kodierende Region reicht vom ersten potentiellen Translationsstart (ATG), Nukleotide 414-416 bis zum Stop-Kodon (TGA), Nukleotide 1521-1523 (siehe Anhang, Abbildung 7-1). In der 5'-nichtkodierenden Region befinden sich im Leseraster des Klons 18-1 zwei Stop-Kodons (TGA, Positionen 123-125, 291-293), so daß 5' keine längeren offenen Leseraster von Klon 18-1 existieren können. Potentielle Polyadenylierungssignale sind mit den Nukleotiden 2284-2289 (AAUAAA) und 2292-2297 (AAUAAA) vorhanden (Abbildung 4-5).

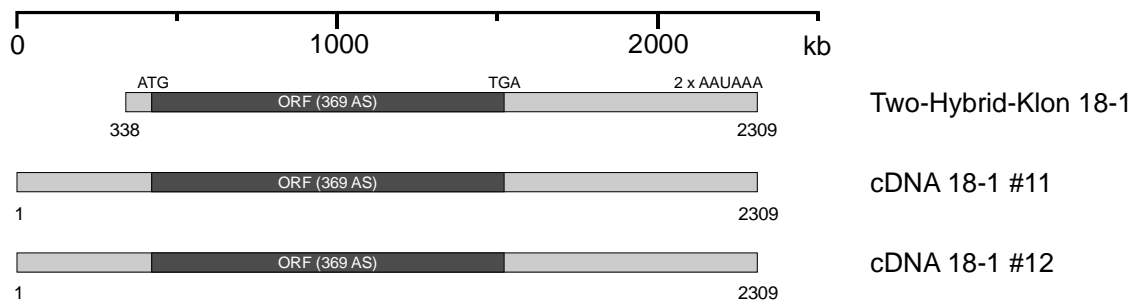


Abbildung 4-5. Zu Two-Hybrid-Klon 18-1 homologe cDNA-Klone. Die längsten zu 18-1 homologen cDNA-Klone wiesen keine Unterschiede zu dem Two-Hybrid-Klon 18-1 in der kodierenden und in der 3'-nichtkodierenden Region auf und vervollständigten die 5'-nichtkodierende Region.

In der sehr prolinreichen Aminosäuresequenz von Klon 18-1 (siehe Anhang, Abbildung 7-1) sind insgesamt 21 potentiell SH3-bindende PXXP-Motive vorhanden, von denen drei der Typ 2-Konsensussequenz für SH3-bindende Motive entsprechen (Yu *et al.*, 1994). Da jedoch auch SH3-bindende Motive bekannt sind, die nicht den Typ 1- oder Typ 2-Konsensusmotiven zuzuordnen sind (Yu *et al.*, 1994; Mongiovi *et al.*, 1999), kommen alle 21 PXXP-Motive für eine Interaktion mit der PACSIN 1-SH3-Domäne in Frage.

4.2.3 Expression von Klon 18-1

4.2.3.1 Northern Blot

Da PACSIN 1 eine auf Gehirn beschränkte Expression aufweist (Plomann *et al.*, 1998), ist es wichtig, die Gewebeverteilung der PACSIN 1-bindenden Proteine zu untersuchen.

Zur Analyse der Expression des 18-1-Transkriptes wurde poly(A)⁺-RNA aus verschiedenen Geweben durch Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese größenfraktioniert und auf eine Hybond-XL-Nylonmembran (Amersham) durch Kapillartransfer übertragen. Die Hybridisierung mit einer für den Klon 18-1 spezifischen, radioaktiv markierten Sonde (Eco RI-Xho I-Fragment, Nukleotide 338-2309) und die anschließende Exposition eines Röntgenfilms ergab eine hirnspezifische Gewebeverteilung (Abbildung 4-6).

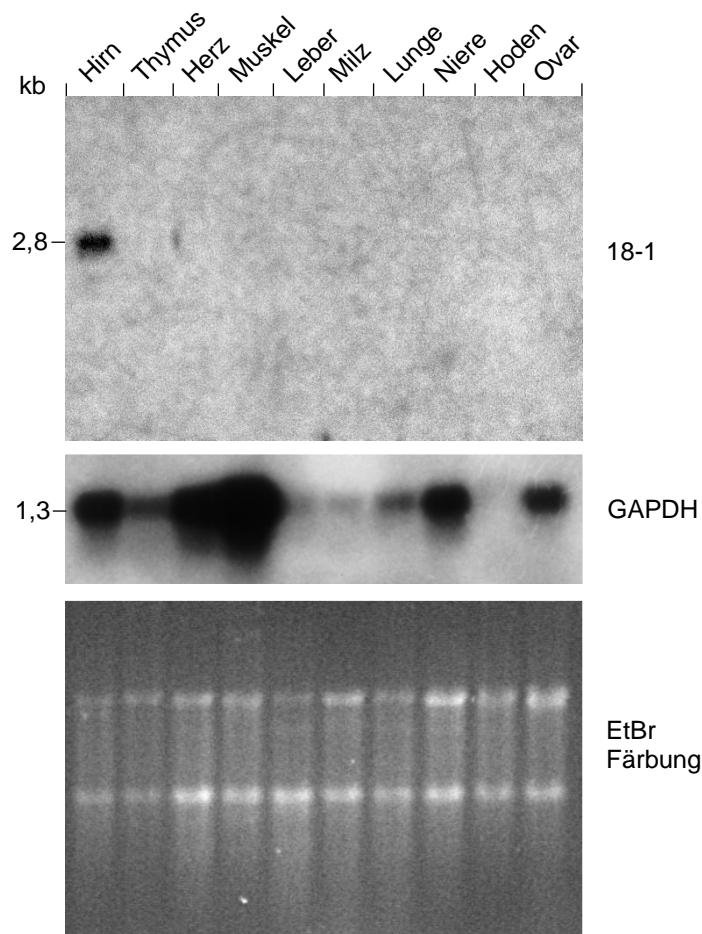


Abbildung 4-6. Gewebespezifische Expression von 18-1. Das 18-1-Transkript wurde in den im Northern Blot untersuchten Geweben ausschließlich in der Hirnspur nachgewiesen.

Das Autoradiogramm des Northern Blots mit einer für 18-1 spezifischen Sonde wies eine einzelne, spezifische Bande von 2,8 kb in der Hirnspur auf (Abbildung 4-6). Diese mRNA-Länge korrespondiert gut mit der Länge der isolierten cDNA-Klone #11 und #12, die 2,3 kb erreichen (Abbildung 4-5).

4.2.3.2 Western Blot

Die Gewebeverteilung von 18-1 wurde zusätzlich im Western Blot verschiedener Mäusegewebe mit 18-1-spezifischen Antikörpern untersucht.

Hierzu wurde die cDNA des Klons 18-1 mit Bgl II aus Plasmid pACT2/18-1 herausgeschnitten, in die BamH I-Schnittstelle des Plasmids pGEX-3X in das Leseraster der Glutathion-S-Transferase kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Nach Expression des GST-18-1-Fusionsproteins in *E. coli* BL21 wurde mit 500 µg des aufgereinigten Proteins ein Kaninchen immunisiert. Die so erhaltenen polyklonalen Antikörper gegen 18-1

wurden auf Spezifität und Titer getestet und zum Nachweis des 18-1-Proteins in adulten Mausgeweben im Western Blot eingesetzt (Abbildung 4-7).

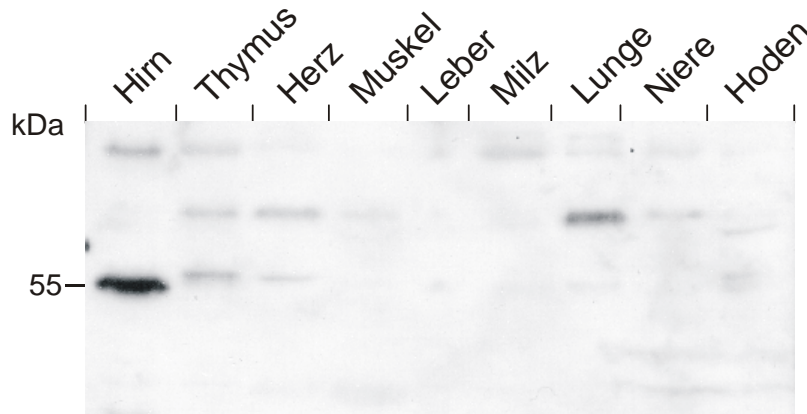


Abbildung 4-7. 18-1 Western Blot. Zur Analyse der Gewebeverteilung wurden je 100 µg Protein pro Mausgewebe mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit 18-1-spezifischen Primärantikörpern (1:5000) und HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern sowie ECL-Färbung nachgewiesen. Die 18-1-spezifischen Antikörper detektierten eine Bande bei 55 kDa.

Mit Hilfe der 18-1-spezifischen Antikörper wurde ein starkes Signal bei 55 kDa im Hirngewebeextrakt nachgewiesen (Abbildung 4-7). Da 18-1 zu 20,6 % aus Prolin besteht, könnten schwächere Banden, die nach längerer Exposition detektiert wurden, unspezifische Kreuzreaktionen mit prolinreichen Sequenzen anderer Proteine sein.

4.2.4 Intrazelluläre Verteilung

Die miteinander interagierenden Proteine 18-1 und PACSIN 1 sollten zumindest eine in Teilen überlappende intrazelluläre Verteilung aufweisen, die sich mittels konfokaler Laser-Fluoreszenzmikroskopie nachweisen läßt. Insbesondere besitzen die an der clathrinvermittelten Endozytose beteiligten Proteine eine charakteristische vesikuläre Verteilung in Zellen.

Daher wurde die intrazelluläre Verteilung von 18-1 in NIH 3T3 Fibroblasten analysiert, die HA-18-1-Fusionsprotein (pHA-CMV/18-1) und Myc-PACSIN 1-Fusionsprotein (pMyc/PACSIN 1; Ritter, 2001) überexprimierten. Dabei zeigte sich, daß 18-1 in einem Teil der Zellen eine Vesikel-ähnliche Verteilung im Zytosol annimmt, während es in anderen Zellen im Zellkern bzw. um den Zellkern herum lokalisiert ist (Abbildung 4-8). PACSIN 1 weist in den mit HA-18-1 transfizierten Zellen eine typische, Vesikel-ähnliche Lokalisierung auf. Befinden sich beide Proteine im Zytosol, ist eine deutliche Kolo-kalisierung von PACSIN 1 mit 18-1 in der Überlagerung der konfokalen Fluoreszenzaufnahmen ersichtlich (Abbildung 4-8, Mitte).

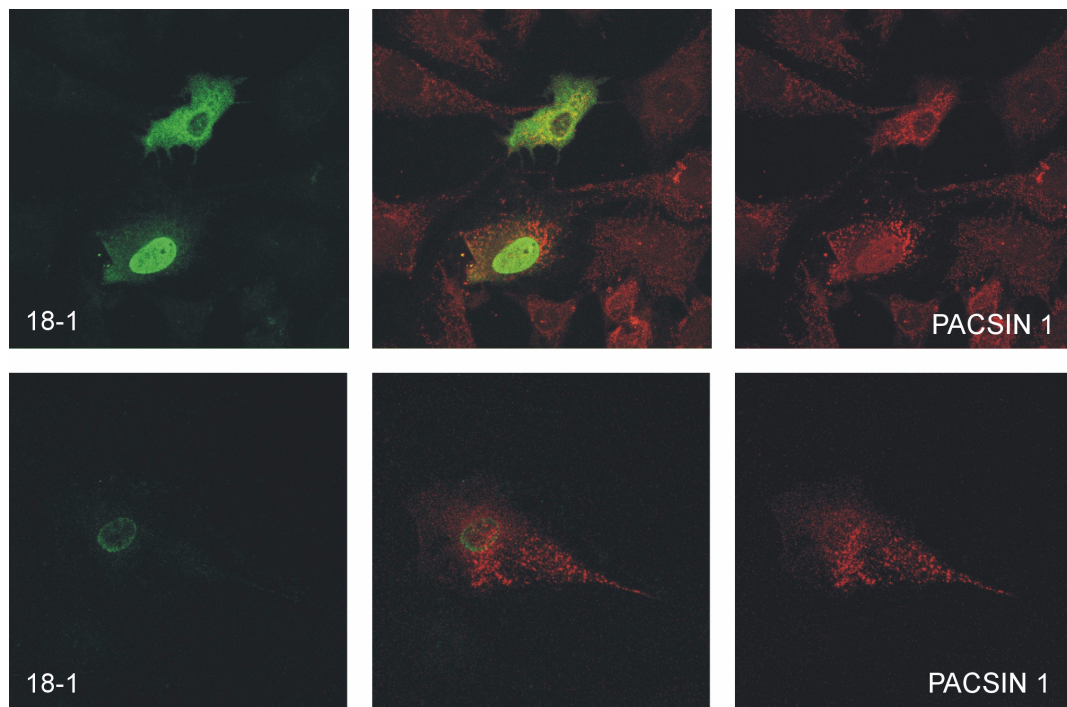


Abbildung 4-8. Intrazelluläre Lokalisation von 18-1. Nach Transfektion von NIH 3T3 Fibroblasten mit Vektoren zur Expression von HA-18-1-Fusionsprotein und Myc-PACSIN 1 wurden die Fusionsproteine mit HA-tag-spezifischen bzw. Myc-tag-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Fluoreszenzfärbung mit Immunglobulin-spezifischen fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Sekundärantikörpern wurde durch konfokale Laser-Fluoreszenzmikroskopie detektiert.

4.3 Charakterisierung von Klon 42-14

Da bereits ein Genbank-Eintrag für Klon 42-14 unter dem Namen P140 für ein 140 kDa großes Protein bestand (Zugriffsnummer AF040944), wurde das Protein in Zusammenarbeit mit L. Croci und G. G. Consalez, Mailand, weiter analysiert. Später wurde das Rattenhomolog des Mausproteins P140 als SNAP-25 interacting protein (SNIP) in zwei verschiedenen Spleißvarianten veröffentlicht (Chin *et al.*, 2000).

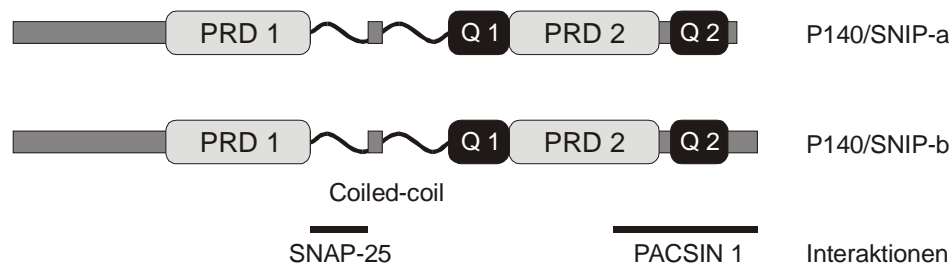


Abbildung 4-9. P140/SNIP-Spleißvarianten. Der PACSIN 1-bindende Two-Hybrid-Klon 42-14 umfaßt nur die carboxyterminalen 264 Aminosäuren der P140/SNIP-b-Spleißvariante. Die Interaktion von SNIP mit SNAP-25 wird durch die Coiled-coil-Region vermittelt (Chin *et al.*, 2000).

Der Two-Hybrid-Klon 42-14 beinhaltet die letzten 264 Aminosäuren der 1197 Aminosäuren und ca. 140 kDa großen P140/SNIP-b-Spleißvariante (Abbildung 4-9). Im weiteren Verlauf der Analysen konnte jedoch keine Interaktion von Klon 42-14/P140 und PACSIN 1 mit proteinchemischen Methoden und den von L. Croci und G. G. Consalez zur Verfügung gestellten Expressionsvektoren und P140-spezifischen Antikörpern detektiert werden, so daß Klon 42-14/P140 nicht weiter analysiert wurde.

4.4 Charakterisierung von Endophilin B1

Zur genaueren Charakterisierung des Two-Hybrid-Klons 48-9 wurde die Sequenz mit Hilfe von Gendatenbanken analysiert und mit den Einträgen verglichen. Es zeigte sich, daß die nächsten Verwandten von 48-9 die Proteine der Endophilin-Familie sind (siehe auch: Abbildung 4-11).

Anhand der weiteren Untersuchungen ergab sich, daß der Two-Hybrid-Klon 48-9 die cDNA eines neuen Mitglieds der Endophilin-Familie beinhaltet. Da die Ähnlichkeit zu den bekannten Endophilinen aber recht niedrig ausfällt (Abbildung 4-12), gehört Klon 48-9 vermutlich zu einer neuen Endophilin-Subfamilie und wird im folgenden mit Endophilin B1 bezeichnet, während die bekannten Endophiline 1, 2 und 3 zur besseren Kennzeichnung der verschiedenen Subfamilien in Endophilin A1, A2 und A3 umbenannt wurden (siehe auch: Huttner und Schmidt, 2000).

Im folgenden bezieht sich daher die Bezeichnung Klon 48-9 explizit auf den mit PACSIN 1 als „bait“ im Two-Hybrid-Screen gefundenen Klon, während allgemein das Mausprotein als Endophilin B1 bezeichnet wird.

4.4.1 Sequenzanalyse des Two-Hybrid-Klons 48-9

Die Protein- und DNA-Sequenzen des Two-Hybrid-Klons 48-9 wurden mit Hilfe des GCG Sequenzanalysesoftwarepaketes (Universität von Wisconsin, Madison, WI, USA) durchgeführt. Verschiedene Gendatenbanken wurden mit den BLAST-Programmen nach Endophilin B1-homologen Sequenzen durchsucht (Altschul *et al.*, 1990).

Das erste potentielle Translationsstartkodon ATG (Nukleotide 271-273) im Endophilin B1-Leseraster erfüllt die Kriterien einer funktionellen Kozak-Sequenz (Kozak, 1991). Das offene Leseraster des Klons endet bei den Nukleotiden 1429-1431 (TAA). Im 3'-nichttranslatierten Bereich befindet sich an den Positionen 1770-1775 ein potentielles Polyadenylierungssignal (AAUAAA).

Die Sequenz des mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems isolierten Klons 48-9 aus Maushirn weist vor dem potentiellen Translationsstart von Endophilin B1 kein Stop-Kodon auf, so daß theoretisch auch längere Transkripte bzw. Endophilin B1-Isoformen existieren könnten (siehe Anhang, Abbildung 7-2). Die zu 48-9 homologe humane Sequenz besitzt jedoch vor dem potentiellen Translationsstart ein Stopkodon im Leseraster von Endophilin B1, so daß es zumindest im Menschen in 5'-Richtung keine längeren Endophilin B1-Isoformen dieses Transkripts geben kann.

Trotzdem wurde zur Verifizierung eine embryonale Maus-cDNA-Bank mit Hilfe einer radioaktiv markierten Sonde nach 48-9-homologen Sequenzen durchmustert, um eventuell längere Transkripte in Maushirn zu identifizieren. Die isolierten zu 48-9 homologen Klone wurden durch Restriktionsanalysen und PCR charakterisiert und die längsten Klone vollständig sequenziert. Desweiteren wurde durch 5'-RACE versucht, zusätzliche Sequenzinformationen 5' zur bekannten Sequenz zu erhalten.

Die im Abbildung 4-10 aufgeführten längsten Klone bestätigten die Sequenz des Two-Hybrid-Klons 48-9. Sowohl die aus der Maus-cDNA-Bank isolierten Klone als auch die mittels RACE-Technik amplifizierten Klone stimmten mit dem Two-Hybrid Klon überein. Allerdings weisen einige der Klone eine Deletion von 63 Basenpaaren auf, ohne jedoch das Leseraster des Two-Hybrid-Klons zu verlassen.

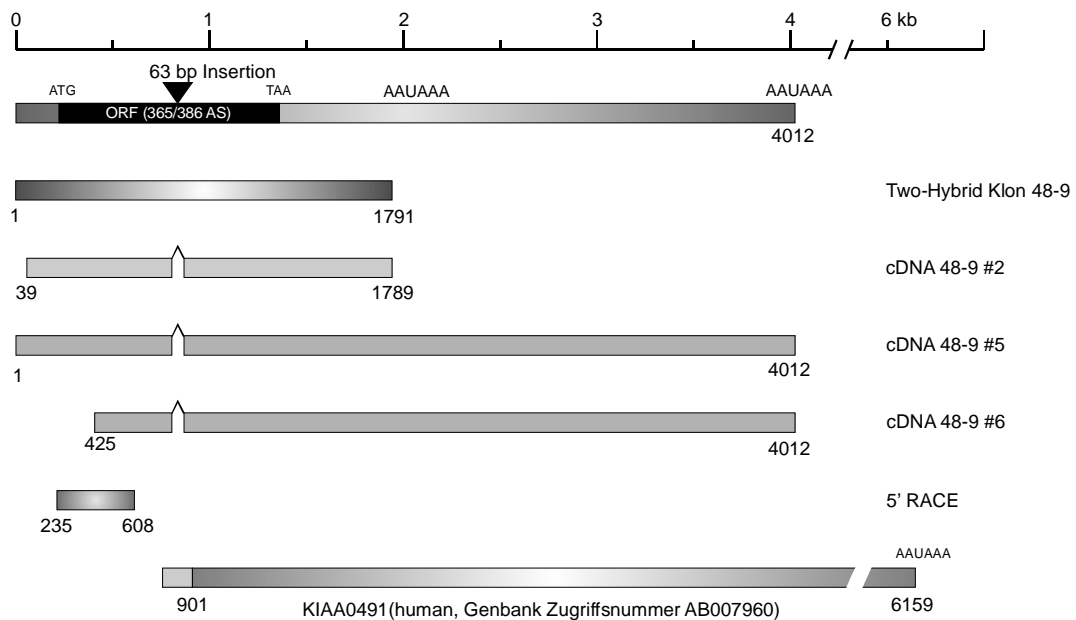


Abbildung 4-10. 48-9 homologe cDNA-Klone.

Die Maus-cDNA-Klone #5 und #6 unterscheiden sich im Vergleich zum Two-Hybrid-Klon 48-9 hauptsächlich in der 3'-nichtkodierenden Region. Während Klon #2 am 3'-Ende bis auf zwei Basen dem Two-Hybrid-Klon gleicht, scheinen die Klone #5 und #6 durch alternative Polyadenylierung entstanden zu sein. Beide vertretenen Klonlängen besitzen potentielle Polyadenylierungssignale kurz vor ihrem 3'-Ende. Der zu Klon 48-9 homologe humane Klon KIAA0491 zeigt, daß es zumindest im Menschen noch ein längeres Transkript gibt, das im 3'-nichtkodierenden Bereich im Vergleich zu den zwei Maus-cDNA-Klonen etwa rund 2100 weitere Basen besitzt.

Aus den Analysen aller Klone wurde die komplette Aminosäuresequenz für Maus-Endophilin B1 ermittelt (siehe Anhang, Abbildung 7-2).

4.4.2 Vergleich der Aminosäuresequenzen der Endophiline

Die Familie der bekannten Endophiline besteht aus drei Mitgliedern, die sich hauptsächlich durch ihre Gewebeverteilung unterscheiden. Vergleicht man das neu gefundene Endophilin B1 mit den bekannten Endophilinen, so zeigt sich, daß in der aminoterminalen Region bestimmte, hoch konservierte Aminosäuremotive vorhanden sind (Abbildung 4-11). In der Verbindungsregion zwischen aminoterminaler LPAAT-Region und besteht nur wenig Homologie zwischen den einzelnen Endophilinen. Auch die SH3-Domänen der Endophiline sind im Falle der drei bekannten Endophiline hoch konserviert, während im neuen Endophilin B1 wiederum nur die für SH3-Domänen funktionell entscheidenden Aminosäuremotive konserviert vorliegen.

Endophilin B1 verschiedener Spezies ist dagegen bis auf den Bereich der Verbindungsregion zwischen LPAAT-Region und SH3-Domäne hoch konserviert.

mEndophilin B1	1	MNIM...DFNVKKLAADAG...TFLSRAVQFTTEKLGQAECTELDAHLENLLSKAECTKIWTEKIMKQTEVL
hEndophilin B1	1	MNIM...DFNVKKLAADAG...TFLSRAVQFTTEKLGQAECTELDAHLENLLSKAECTKIWTEKIMKQTEVL
dEndophilin B1	1	MNINLPNPNVKNLVKEAG...STISRVVQFTTEKLGTTERTEDLHFQNLAEADVTKTWTEKIVRDTESV
F35A5-8	1	~~~M...DFNFKKLASDAG...GFFSRACKLTETTFLLKAERTELDSHFENLLQRAADKEDHTRRLLSAIEGY
mEndophilin A1	1	~~~~~MSVAGLKKQFHKATQKVSSEKVGCAEGTKLDDDFKEMERKVDVSRVAMEITMTKTIEY
mEndophilin A2	1	~~~~~MSVAGLKKQFYKASOLVSEKVGCAEGTKLDDDFKDMKKVDVTSKAVAELVVRTIEY
mEndophilin A3	1	~~~~~MSVAGLKKQFHKASLFSSEKISCAEGTKLDEEFLMKKIDITSKAAVEITLSKATEY
mEndophilin B1	67	LQPNPNARIEEFVYEKLDRAKPSRI...NNPE...LLGOYMIDAGTEFGPGTAYGNALIKCGETQKRIGTA
hEndophilin B1	67	LQPNPNARIEEFVYEKLDRAKPSRI...NNPE...LLGOYMIDAGTEFGPGTAYGNALIKCGETQKRIGTA
dEndophilin B1	69	LIPNPQNRVEDFTFEKLEKSKPKRI...SNLE...HLALDMIEAGCDFGQDLFYQALIKVQAEQKLCQC
F35A5-8	64	LQPNPTVRMEEVVYKLELKKDGAIRQNLE...QLSTAMTEAGEQFGETTIPYGSALLKVAQTEENRLQQA
mEndophilin A1	58	LQPNPASRAKLMSINTMSKIRGQKGPYPQAEALIAEAMLKFGRELDDCNFGPALGEVGEAMRELSEV
mEndophilin A2	58	LQPNPASRAKLMTLNTVSKIRGQVKNPGYPQSEGLGECMVRRHCKELGGSNFGDALDAGESMKRLAEV
mEndophilin A3	58	LQPNPAYRAKLGMLNTVSKLRGQVKATGYPTQTEGLGDCMLKYCKELGEDSDFGNSLVDVGEALKLMAEV
mEndophilin B1	132	DRELIQTSALNFLTPLRNFIEGDYKTIAKERKLLQNKRLDLDAKTRLKAKAAETKSSQINSARPECDN
hEndophilin B1	132	DRELIQTSALNFLTPLRNFIEGDYKTIAKERKLLQNKRLDLDAKTRLKAKAAETKSSQINSARPECDN
dEndophilin B1	134	EHDEIATSCICFTQPLRKFLLGEMKTIQKERGTLETKRLDLDAKNNRVKAKRSMLGQOS
F35A5-8	131	ERELCGQAATNLLPFRFLEGDYKTIQKERKVLNSKRLDLDAKSRLLKAKITVDLQ.TVINSKTSQFET
mEndophilin A1	128	KDSLDMEVKQNFIDPLQNLHDKDLREIQHHLKKLEGRRLDFGYKKKROGKI
mEndophilin A2	128	KDSLDEIVKQNFIDPLQNLCDKDLREIQHHLKKLEGRRLDFDYKKKROGKI
mEndophilin A3	128	KDSLQINVKQTFIDPLQLLODKDLKEIGHHLKKLEGRRLDYDYKRRRVGKI
mEndophilin B1	202	IMIWAEEVTKSBOELRITQSEFDRQAEITRLLLEGISSTHAHHLRCLNDFVEAQMTYYAQCYQYMLDLQK
hEndophilin B1	191SEQELRITQSEFDRQAEITRLLLEGISSTHAHHLRCLNDFVEAQMTYYAQCYQYMLDLQK
dEndophilin B1	193ABRDLRVAQAEFDRQAEITKLLLDGISTQASHLRHLHAFITQOVRYKQCGDVMEQLQR
F35A5-8	200	II.....EQABADVVAQAEFDKQSEITKLLLEGITQAHNNQLKCLRDFVEAQMSFYAQSHOLMADLQR
mEndophilin A1	179PDEELRQALEKFDESKEIAESSMFNLEMDIEQVSQLSALVQALVYHKKQAVCILQQVTV
mEndophilin A2	179PDEELRQALEKFDESKEVAETSMHNLLETIDIEQVSQLSALVDAQLDVHRQAVCILLEEDAD
mEndophilin A3	179PDEELRQAVEKFDESKEIAEASMFNLENDVEQVSQLAVFVEAALDYHROSTEILOELQS
mEndophilin B1	272	QL.....GSFSPSNYLSNNQTS.....GTPVPYALSNAIG..PS
hEndophilin B1	251	QL.....GSFSPSNYLSNNQTS.....VTPVPSVLPNAIG..SS
dEndophilin B1	253	ELAKMQHPKRLRINSEDVDCGPPSSVMHSCDSLSLGGIALDSDPDPLDNLGGTTPYIPLDVNEASAS
F35A5-8	263	EL.....SGTMSFRGSSA.....ILVNSGDPEN
mEndophilin A1	239	RLEERIRQASSQERREYQPKPRMS.....LEFATGDSQPNGLL..
mEndophilin A2	239	KLKRRVREASSREKREFKPRPREP.....FEL..GBLEQPNNGGPEC
mEndophilin A3	239	KLELRISLASKVEKREFMPKP.....VNMSSTDANGVEB..
mEndophilin B1	304	AAASTGSLVITQPSNLNDLKESNNRK.....ARVLYDYDAANSTELSLLADEVITVFSVV
hEndophilin B1	283	AAASTGSLVITQPSNLSDLKESGSRK.....ARVLYDYDAANSTELSLLADEVITVFSVV
dEndophilin B1	323	KSNISSGAAARGPCNNHSANMAATGHKPNQPMHVSTDQMQRARVLCSYDAKDHTENLNSAEVIFVTECS
F35A5-8	287	GRTMAAAIAAARPSGL...LPDDLGTQK.....ARVIMDYDAVLPQELSVTQNDILIVYRLP
mEndophilin A1	278SHTGTGPK...PGVQM.....DQPC.CRALYDLEPENEGELAFKEGDIITLTN..
mEndophilin A2	278	APAPKITASSSFRSSDKPIRMPKSKMPPPL.....DQPS.CKALYDFEPENDGELGFREGDILTLTN..
mEndophilin A3	273SSSSKTETGDTTP.....A.....DQPC.CRLYDFEPENEGELGFKEGDIITLTN..
mEndophilin B1	360	GMSDSDWLMGERGNQKGKVPITYLELLN*
hEndophilin B1	339	GMSDSDWLMGERGNQKGKVPITYLELLN*
dEndophilin B1	393	PVNEDYMYCKQGLLKGLVPRAFVEMLDEEHDVTL*
F35A5-8	341	GMDAEYVMAEKGGKRGKLPVSYIELL*
mEndophilin A1	322	QIDENWYECMLHCQSGFFPILNYVEITLVALPH*
mEndophilin A2	338	QIDENWYECMLHCQSGFFPLSYVQVLVPLPQ*
mEndophilin A3	317	QIDENWYECMLRGESGFFPILNYVEIVPLPP*

Abbildung 4-11. Vergleich der Aminosäuresequenzen von Maus-Endophilin B1 (mEndophilin B1), humanem Endophilin B1 (hEndophilin B1) sowie *Drosophila melanogaster* Endophilin B1 (dEndophilin B1) mit den bekannten Maus-Endophilinen A1, A2 und A3 (mEndophilin A1, A2 und A3) und einem offenen Leseraster eines *Caenorhabditis elegans* Transkripts (F35A5-8). Zu Maus-Endophilin B1 konservierte Aminosäuren sind invers dargestellt (weiße Schrift auf schwarzem Hintergrund), ähnliche Aminosäuren dagegen grau schattiert. Nicht konservierte Bereiche (Schwarze Schrift auf weißem Hintergrund) wurden zum Ausgleich unterschiedlicher Proteinlängen durch Einfügen von Punkten angepaßt.

Betrachtet man den strukturellen Aufbau der funktionellen Untereinheiten der Endophiline, so wird deutlich, daß Endophilin B1 zwar keine auffallend hohe Identität oder Ähnlichkeit zu den Endophilinen A1, A2 und A3 zeigt, der grundsätzliche Aufbau jedoch identisch ist. Endophilin B1 ist daher als entfernt verwandtes Protein der Endophilin-Familie in eine neue Subfamilie einzuordnen (Abbildung 4-12).

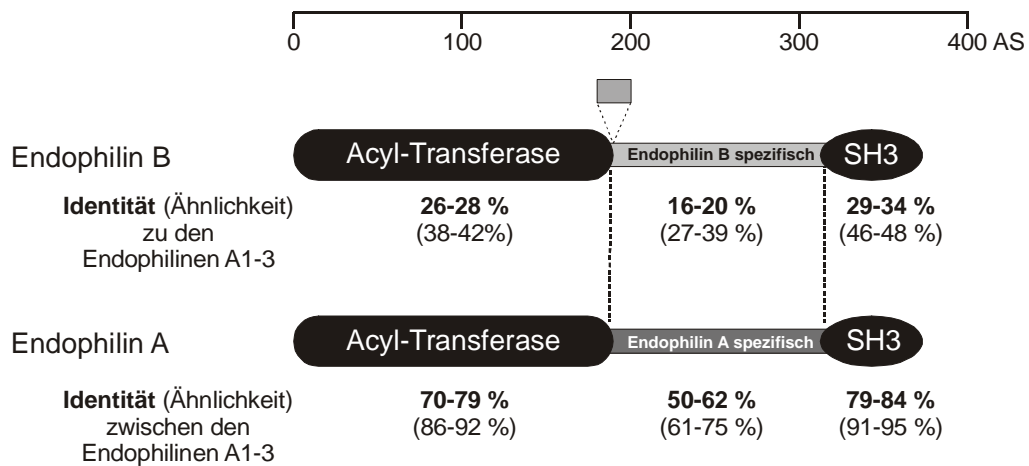


Abbildung 4-12. Vergleich der Endophilin-Subfamilien. Die Proteinsequenzen der drei bekannten Endophiline A1, 2 und 3 wurden einzeln miteinander und mit Endophilin B1 verglichen (BLAST; Altschul *et al.*, 1990). Das neu entdeckte Endophilin B1 weist nur geringe Identität zu den stark konservierten bekannten Endophilinen A1, A2 und A3 auf. Die Mitglieder der Endophilin A-Subfamilie sind vor allem im Bereich der Acyl-Transferase-Region und der SH3-Domäne hoch konserviert.

4.4.3 Charakterisierung der Bindung an PACSIN 1

4.4.3.1 Erstellung einer Endophilin B1-Deletionsmutante

Da Endophilin B1 mit der SH3-Domäne von PACSIN 1 interagiert, wurde die Aminosäuresequenz des an PACSIN 1 bindenden Two-Hybrid-Klons auf prolinreiche Motive hin untersucht.

Insgesamt drei prolinreiche Motive mit der Aminosäuresequenz PXXP (X, jede beliebige Aminosäure) konnten an den Aminosäurepositionen 36-39, 56-59 und 74-77 des Two-Hybrid-Klons 48-9 nach der Gal 4-transkriptionsaktivierenden Domäne identifiziert werden. Diese Motive liegen jedoch in der 5'-nichttranslatierten Region von Endophilin B1, die nur im Two-Hybrid-Klon 48-9 in Form des Gal 4-Fusionsproteins exprimiert wird (Abbildung 4-13).

Um festzustellen, ob diese Motive für die Interaktion mit PACSIN 1 verwendet werden, wurde eine Deletionsmutante von Klon 48-9 erstellt, die das gesamte offene Leseraster

von Endophilin B1 enthält, der jedoch die systembedingt artifiziell translatierten Aminosäuren 1-81 des Two-Hybrid-Klons fehlen (48-9 Δ NT, Abbildung 4-13).

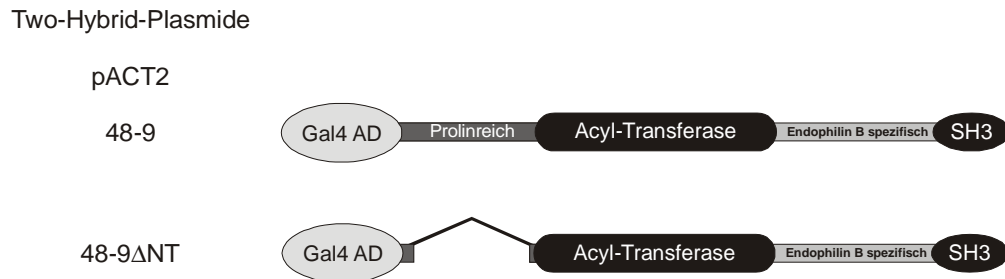


Abbildung 4-13. Deletionsmutante des Two-Hybrid-Klons 48-9. Zur genaueren Analyse der Interaktion mit PACSIN 1 wurde die prolinreiche Region (Aminosäuren 1-81) des Two-Hybrid-Klons 48-9 so deletiert, daß nur noch das offene Leseraster von Endophilin B1 als Gal4-Fusionsprotein exprimiert wurde.

Hierzu wurde aus dem Plasmid pACT-2/48-9 ein Sma I/Nae I-Fragment durch Restriktionsenzyme entfernt und der Rest des Plasmids religiert. Das korrekte Leseraster wurde durch Nco I-Restriktionsverdau, anschließender Auffüllung der kohäsiven Enden und Religation wiederhergestellt und durch Sequenzierung kontrolliert.

4.4.3.2 Two-Hybrid-Analyse der Endophilin B1-Deletionsmutante

Mit Hilfe der zuvor beschriebenen Deletionsmutanten von PACSIN 1 und Klon 48-9 wurden die Bindungsmotive im Two-Hybrid-System auf beiden Proteinen eingegrenzt.

Hierzu wurden nach Kotransformation von Y190 Hefen mit den jeweiligen Hefeexpressionsvektoren von PACSIN 1, PACSIN 1 Δ SH3, 48-9 und 48-9 Δ NT das Wachstum der Hefen auf Selektionsmedium und anschließend die β -Galaktosidase-Aktivität untersucht.

Die Bindung des Two-Hybrid-Klons 48-9 an die SH3-Domäne von PACSIN 1 erfordert die aminoterminal prolinreiche Region des Two-Hybrid-Klons. Ist diese Region, die in der natürlichen Aminosäuresequenz von Endophilin B1 nicht translatiert wird, deletiert, bindet Endophilin B1 nicht mehr an die SH3-Domäne von PACSIN 1 (Tabelle 4-4).

pAS2-1	---	pACT2 48-9	48-9ΔNT
---	-	-	-
PACSIN 1	-	++	-
PACSIN 1ΔSH3	-	-	-

Tabelle 4-4. Ergebnisse der Two-Hybrid-Analyse der Interaktion von Klon 48-9 mit PACSIN 1. PACSIN 1 voller Länge und die PACSIN 1-SH3-Deletionsmutante wurden gegen Klon 48-9 voller Länge und die aminoterminalen Deletionsmutante ohne prolinreiche Region getestet. Nur die Proteine voller Länge interagierten miteinander, wie die Aktivierung der Reportergene in Y190 Hefen ergab (++, starkes Wachstum, Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test nach 2-4 h; -, kein oder nur geringes Wachstum, keine Blaufärbung nach 8 h).

4.4.4 Rekombinante Expression von Endophilin B1

4.4.4.1 GST-Endophilin B1 Fusionsproteine

Zur bakteriellen Expression von rekombinantem GST-Endophilin B1 wurde der kodierende Bereich der Endophilin B1 cDNA durch Bgl II-Restriktionsverdau aus dem Two-Hybrid-Vektor pACT2/Endophilin B1ΔNT isoliert, in die BamH I-Endonukleaseschnittstelle des Expressionsvektors pGEX-3X in das Leseraster der Glutathion-S-Transferase kloniert und durch Sequenzierung überprüft.

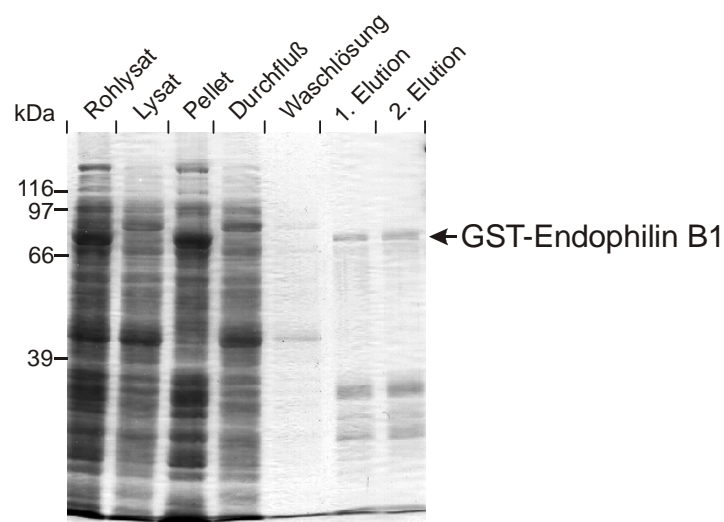


Abbildung 4-14. Aufreinigung von GST-Endophilin B1 (SDS-PAGE). In der vom Rohlysate abgetrennten unlöslichen Fraktion (Pellet) befindet sich ein Großteil des GST-Endophilin B1, so daß aus dem Überstand (Lysat) nur eine geringe Menge GST-Endophilin B1-Fusionsprotein aufgereinigt werden konnte.

Die Expression des Fusionsproteins erfolgte in *E. coli* BL21 bei 28°C. Die anschließende Aufreinigung ergab nur geringe Ausbeuten, da ein großer Teil des Fusionsproteins bei der Abtrennung unlöslicher Bakterienbestandteile durch Zentrifugation verloren ging (Abbildung 4-14). Dieser Verlust konnte durch den Einsatz von Detergenzien während der Reinigung verringert werden. Zusätzlich wurde GST-Endophilin B1 zu Fragmenten kleiner 35 kDa degradiert, obwohl der proteasedefiziente Bakterienstamm *E. coli* BL21 zur Expression eingesetzt wurde. Diese Fragmente wurden mit aufgereinigt, da sie weiterhin die Glutathion-S-Transferase enthielten, wie ein Western Blot mit anschließendem Nachweis mit GST-spezifischen Antikörpern zeigte.

Da Endophilin B1 vermutlich über seine aminoterminal LPAAT-Domäne mit schwerlöslichen Membranbestandteilen interagieren kann, wurde eine LPAAT-Deletionsmutante generiert, die nur die carboxyterminalen Endophilin-Bereiche (Endophilin B1-CT, Aminosäuren 184-386) umfaßt. Hierzu wurde aus dem Plasmid pBluescriptSK/48-9 der für die aminoterminal Region kodierende cDNA-Bereich mit Pst I entfernt und der verbliebene Bereich über die BamH I und Xho I-Schnittstellen in den Vektor pACT2 kloniert. Von dort wurde die Deletions-cDNA über BamH I/Bgl II isoliert und in die BamH I-Schnittstelle des Expressionsvektors pGEX-3X kloniert.

Nach Expression und Aufreinigung wurden 800 µg GST-Endophilin B1-CT-Fusionsprotein aus 500 ml Kulturvolumen erhalten. Auch hier zeigten sich spezifische Abbauprodukte des Fusionsproteins (Abbildung 4-15).

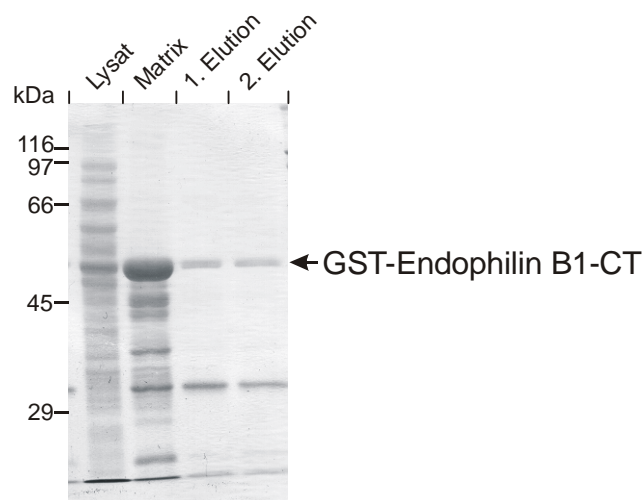


Abbildung 4-15. Aufreinigung von GST-Endophilin B1-CT (SDS-PAGE). Aus dem Lysat wurde GST-Endophilin B1-CT über Glutathion-Sepharose 4B (Matrix) aufgereinigt. Die Eluate wiesen wenige, spezifische Abbauprodukte auf, die die aminoterminal Glutathion-S-Transferase noch beinhalteten und daher mit aufgereinigt wurden.

4.4.4.2 HA-Fusionsprotein

Zur eukaryotischen Expression von Endophilin B1 wurde das offene Leseraster aus dem Plasmid pACT2/48-9ΔNT über Bgl II isoliert, in die BamH I-Schnittstelle des Expressionsvektors pHA-CMV in das Leseraster des HA-tags kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Die korrekte Expression des HA-Endophilin B1-Fusionsproteins wurde durch Western Blot mit HA-tag-spezifischen Antikörpern und ECL-Färbung nachgewiesen (hier nicht gezeigt).

4.4.5 Gewebespezifische Expression von Endophilin B1

4.4.5.1 Northern Blot

Die gewebespezifische Verteilung der Endophilin B1-Transkripte wurde mit Hilfe eines Northern Blots charakterisiert. Hierzu wurden poly(A)⁺-RNA-Proben aus verschiedenen Mausgeweben isoliert, durch Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese größenfraktioniert und auf eine Nylonmembran transferiert.

Ein sehr starkes, in allen untersuchten Geweben vorkommendes Signal bei 2,6 kb stellt das Haupttranskript dar, nach Überbelichtung zeigen sich auch schwächere Signale. So wurden die Signale bei 5,0, 6,5 und 8,0 kb nur nach längeren Expositionszeiten von 96 h nachgewiesen (Abbildung 4-16).

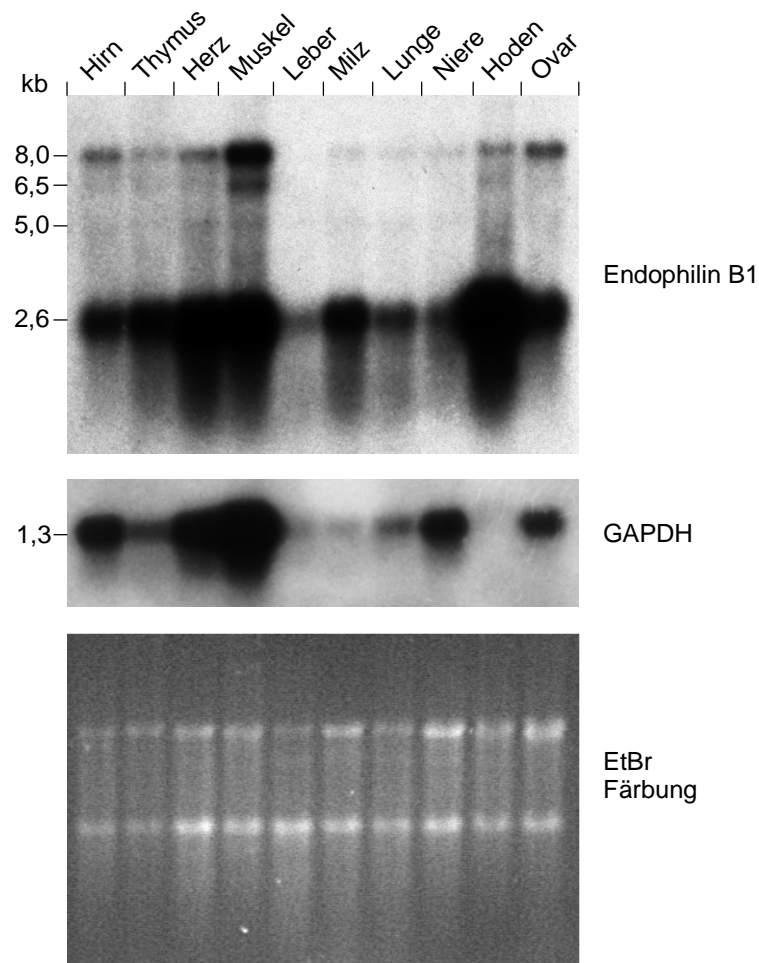


Abbildung 4-16. Expression der Endophilin B1 mRNA (Northern Blot). Die mit Hilfe einer Endophilin B1-spezifischen radioaktiv markierten Sonde nachgewiesene mRNA kam als 2,6 kb-Transkript in allen untersuchten Geweben vor. Schwächere Transkripte bei 5,0, 6,5, und 8,0 kb wurden durch längere Exposition des Autoradiogramms sichtbar. Die Integrität der mRNA wurde durch Ethidiumbromid-Färbung des Agarosegels und durch Hybridisierung des Blots mit einer GAPDH-spezifischen Sonde überprüft.

4.4.5.2 Western Blot

Zur Analyse der Proteinverteilung wurden Proteinextrakte verschiedener Mausgewebe im Western Blot mit Endophilin B1-spezifischen Antikörpern analysiert. Hierzu wurde ein Kaninchen mit 500 µg GST-Endophilin Δ NT-Fusionsprotein immunisiert. Die im Serum enthaltenen polyklonalen Antikörper gegen Endophilin B1 wurden auf Spezifität und Titer getestet. Die Verteilung des Endophilin B1-Proteins in adulten Mausgeweben wurde durch Western Blot analysiert (Abbildung 4-17).

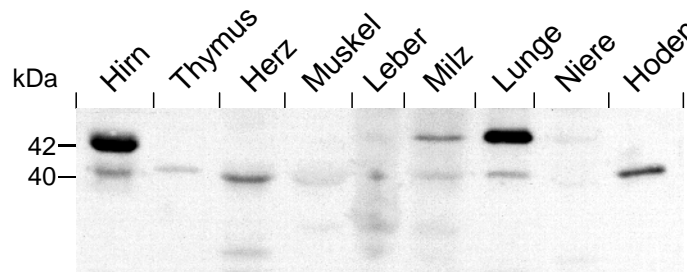


Abbildung 4-17. Endophilin B1 Western Blot. Zur Expressionsanalyse von Endophilin B1 wurden 100 µg Protein pro Gewebe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western Blot mit Endophilin B1-spezifischen Erstantikörpern (Verdünnung 1:20000) und HRP-gekoppelten Zweitantikörpern sowie ECL-Färbung nachgewiesen.

Die Endophilin B1-spezifischen Antikörper detektierten in hoher Verdünnung (1:40000) ausschließlich ein starkes Signal bei 42 kDa im Hirngewebeextrakt. Eine schwächere Bande bei 40 kDa, die vermutlich die ubiquitäre Endophilin B1-Spleißform darstellt, konnte in fast allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden, wenn die Antikörper mindestens doppelt so konzentriert (1:20000) eingesetzt wurden, während starke Signale in Milz und Lunge nicht zugeordnet werden konnten und auf weitere, bisher unbekannte Spleißvarianten hinweisen (Abbildung 4-17), die möglicherweise dem längeren *Drosophila*-Endophilin B1 entsprechen (Abbildung 4-11).

4.4.5.3 Genomische Organisation des humanen Endophilin B1-Gens

Aufgrund der verschiedenen Hinweise auf alternatives Spleißen und alternative Polyadenylierung wurde die genomische Struktur von Endophilin B1 genauer analysiert. Hierzu wurde die Genbank mit der cDNA-Sequenz von Endophilin B1 durchsucht und ein unvollständig sequenziertes Fragment (Genbank Zugriffsnummer AL049597) aus humaner genomischer DNA als Endophilin B1-Gen indentifiziert. Dieses Fragment enthielt die Sequenz aller Exons des Endophilin B1-Gens.

Das Endophilin B1-Gen besteht aus 11 Exons von 24 bp bis zu 5 kb Länge und Intronsequenzen von 0,4 kb bis 10 kb Länge (Abbildung 4-18). Ein Vergleich dieser Sequenz mit bekannten Endophilin B1-cDNA-Sequenzen ergab, daß Exon 6 und 7 zusätzlich in hirnspezifischen Transkripten enthalten waren. Die sich in der 3'-nichttranslatierten Region unterscheidenden cDNA-Klone von Endophilin B1 und die Größenunterschiede der Signale im Northern Blot konnten daher nur mit alternativem Polyadenylieren des Endophilin B1-Transkripts erklärt werden. Tatsächlich befinden sich in der Sequenz von Exon 11 mehrere potentielle Polyadenylierungssignale, von denen zumindest zwei auch verwendet werden, da sie den Transkriptlängen von 2,6 und 5 kb entsprechen.

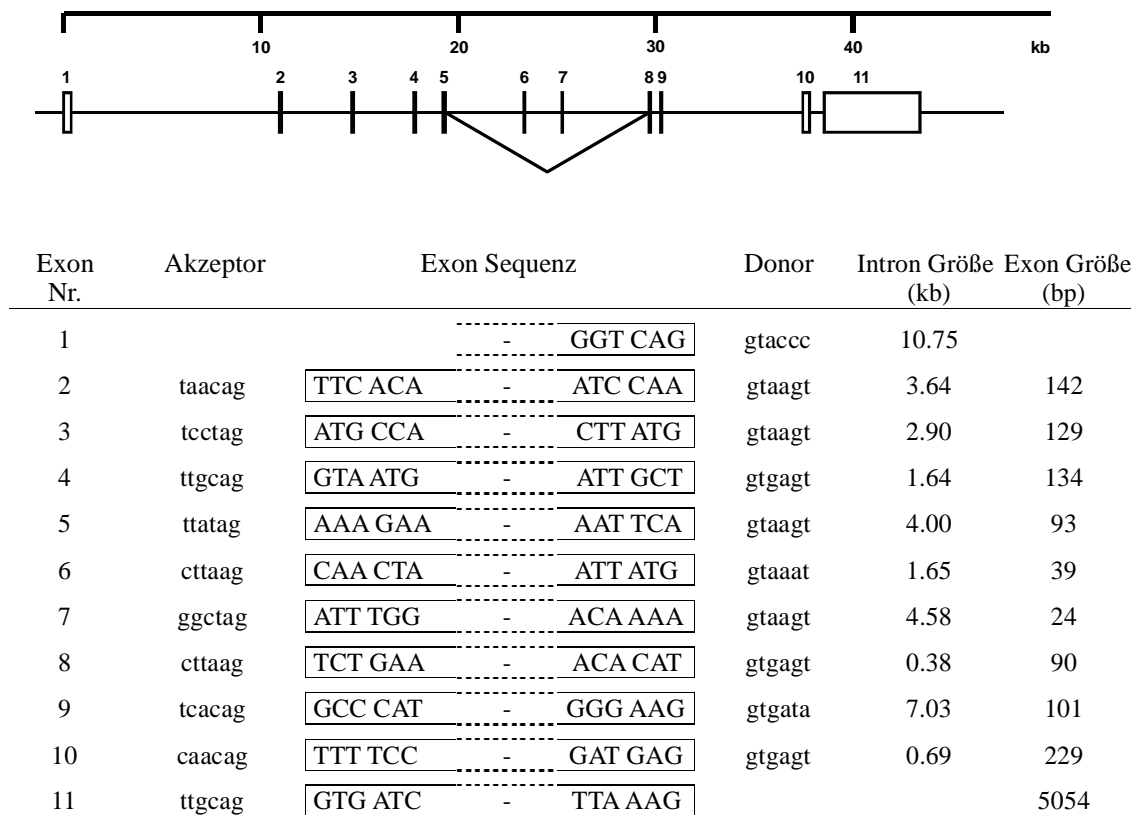


Abbildung 4-18. Genomische Organisation von humanem Endophilin B1. Ein in der Genbank veröffentlichtes Fragment humaner genomischer DNA enthält das Endophilin B1 Gen mit 11 Exons (Zugriffsnummer AL049597).

4.4.5.4 Hirnspezifisches Spleißen des Endophilin B1-Transkripts

Da sowohl die verschiedenen Endophilin B1-cDNA-Klone, EST-Klone in der Genbank als auch die genomische Struktur von Endophilin B1 darauf hinweisen, daß Exon 6 und 7 nur in einem Teil der Endophilin B1-Transkripte enthalten sind, wurde das Spleißen von Exon 6 und 7 genauer analysiert. Hierzu wurde mittels RT-PCR und den Oligonukleotiden 48-9s775 und 48-9as1235 ein Fragment der Endophilin B1-mRNA amplifiziert, das vom Ende des Exons 5 bis zum Anfang des Exon 10 reicht. Die PCR-Produkte wurden per TE-PAGE aufgetrennt und durch Southern Blot mit einer Endophilin B1-spezifischen Sonde (Basen 1-1791) nachgewiesen (Abbildung 4-19).

Die erwartete Länge für PCR-Produkte der oben aufgeführten Oligonukleotide, die Exon 6 und 7 beinhalten, beträgt 460 bp und 397 bp für Transkripte ohne Exon 6 und 7. Anhand des Autoradiogramms läßt sich durch einen Vergleich mit einem parallel aufgetragenen Längenmarker schließen, daß Exon 6 und 7 nur im Gehirn exprimiert werden, da in allen anderen untersuchten Geweben nur das kürzere PCR-Produkt nachgewiesen werden kann.

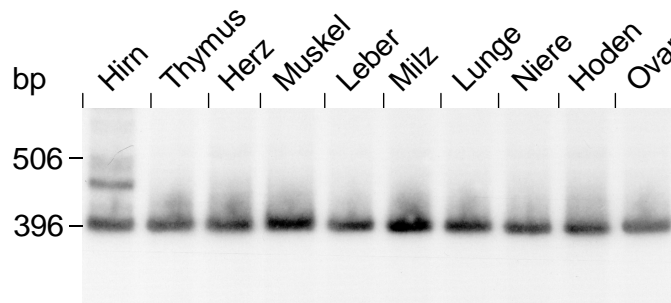


Abbildung 4-19. Hirnspezifisches Spleißen des Endophilin B1-Transkripts (Southern Blot). Das 460 bp große RT-PCR-Produkt, das Exon 6 und 7 enthält, kann nur in Hirngewebe nachgewiesen werden.

4.4.6 LPAAT-Aktivität von Endophilin B1

Der Vergleich von Endophilin B1 mit den bekannten Endophilinen legt nahe, daß auch Endophilin B1 Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase-Aktivität besitzt, da alle Mitglieder der Endophilin-Familie eine homologe aminoterminal Region besitzen. Der nur geringe Anteil an konservierten Aminosäuremotiven macht eigene Untersuchungen zur Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase-Aktivität von Endophilin B1 notwendig. Als Acyl-Transferase sollte Endophilin B1 an aktivierte Fettsäuren in Form von Acyl-Coenzym A binden können.

4.4.6.1 Bindung an aktivierte Fettsäuren

Die Bindung von aktivierten Fettsäuren an Endophilin B1 wurde mit Hilfe von rekombinant hergestelltem Endophilin B1 untersucht.

HA-Endophilin B1-Fusionsprotein wurde in NIH 3T3 Fibroblasten exprimiert. Nach Lyse der Zellen wurde HA-Endophilin B1 spezifisch mit an Agarose immobilisiertem Palmitoyl-Coenzym A präzipitiert. Die anschließende Elution von der Matrix mit freiem Palmitoyl-Coenzym A war spezifisch, denn selbst hohe Konzentrationen von Detergenzien (1 % Triton X-100) konnten die Endophilin B1-Acyl-CoA-Interaktion nicht unterbrechen (Abbildung 4-20).

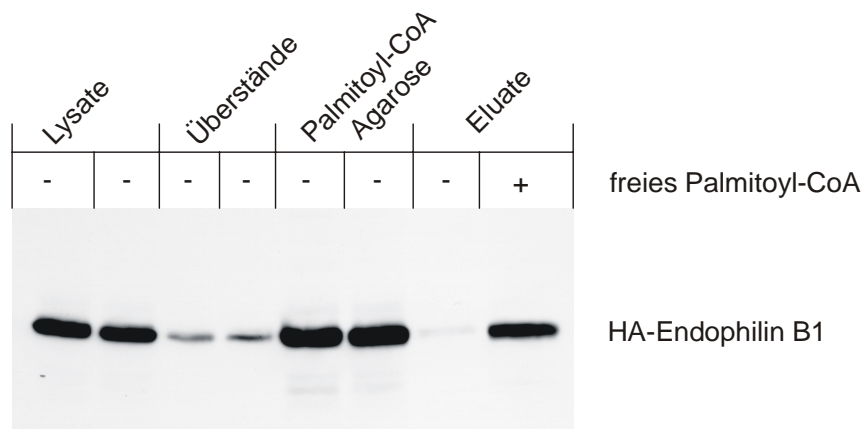


Abbildung 4-20. Endophilin B1 interagiert mit Palmitoyl-Coenzym A. Aus Lysaten, die HA-Endophilin B1-Fusionsprotein enthielten, wurde HA-Endophilin B1 mit Palmitoyl-Coenzym A-Agarose präzipitiert und konnte spezifisch mit freiem Palmitoyl-Coenzym A eluiert werden.

4.4.6.2 Analyse der Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase-Aktivität

Die für Endophilin B1 veröffentlichte Methode zum Nachweis der LPAAT-Aktivität beruht auf einem *in vitro*-Experiment mit gereinigtem Enzym (Schmidt *et al.*, 1999). Der Transfer von radioaktiv markierten Acyl-Gruppen auf Lysophosphatidsäure wird durch Dünnschichtchromatographie analysiert.

Die enzymatische Aktivität von Endophilin B1 wurde anhand der Übertragung der radioaktiv markierten 1- ^{14}C -Arachidonsäure von Coenzym A auf Lysophosphatidsäure in Zusammenarbeit mit A. Schmidt und W. Huttner nachgewiesen. In der Reaktion nach Schmidt *et al.* (1999) wurde rekombinant als GST-Fusionsprotein hergestelltes Endophilin B1 bzw. das Fusionsprotein aus GST und einer Deletionsmutante von Endophilin B1 ohne die carboxyterminale SH3-Domäne eingesetzt und mit GST als Negativkontrolle und Endophilin A1 als Positivkontrolle verglichen (Abbildung 4-21).

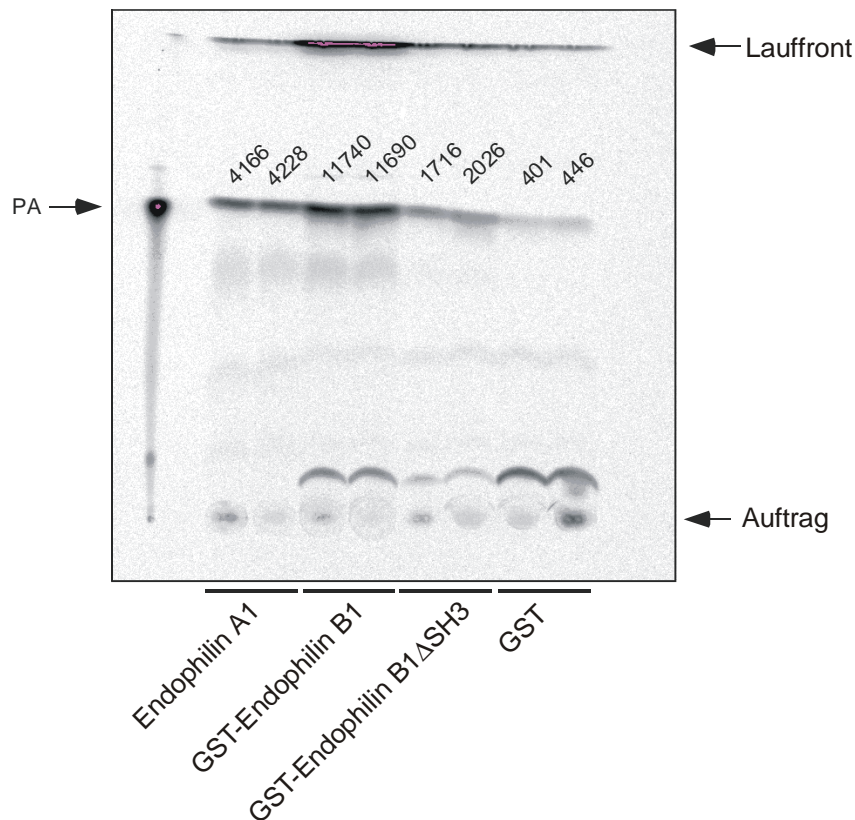


Abbildung 4-21. LPAAT-Aktivität von Endophilin B1. Die Ansätze der Acyl-Transferase-Reaktionen von Endophilin A1, GST-Endophilin B1, GST-Endophilin B1 Δ SH3 und GST sowie ein Phosphatidsäurestandard (PA) wurden einer Dünnschichtchromatographie unterzogen und anschließend mit einem Phosphoimager ausgewertet. Die den Banden zugeordneten Zahlenwerte entsprechen den detektierten radioaktiven Zerfällen.

Das abgebildete Autoradiogramm der enzymatischen Reaktionen (Abbildung 4-21) ergab nach Auswertung mit einem Phosphoimager zum Nachweis der radioaktiv markierten Phosphatidsäure, daß Endophilin B1 eine dreifach größere LPAAT-Aktivität als eine äquivalente Menge Endophilin A1 und eine 28-fach größere LPAAT-Aktivität als die GST-Negativkontrolle aufweist. Endophilin B1 als Vertreter der neuen Endophilin-Subfamilie B besitzt daher auch die schon für Endophilin A1 beschriebene LPAAT-Aktivität.

4.4.7 Bindungspartner von Endophilin

4.4.7.1 Präzipitation mit rekombinantem Endophilin B1

Zur Ermittlung der Bindungspartner von Endophilin B1 und dem Vergleich mit den Endophilinen A1 und A3 wurden immobilisierte Endophilin-GST-Fusionsproteine mit

Extrakten aus Hirnproteinen inkubiert und die gebundenen Proteine mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert („Pull down“).

Im einzelnen wurden die rekombinant hergestellten GST-Endophilin-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose 4B gebunden mit Gewebeextrakten inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen wurden die Interaktionspartner der Endophiline mit SDS-PAGE Probenpuffer von der Matrix eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Hierzu wurde der Blot mit spezifischen Antikörpern gegen bekannte und potentielle Bindungspartner umgesetzt (Abbildung 4-22).

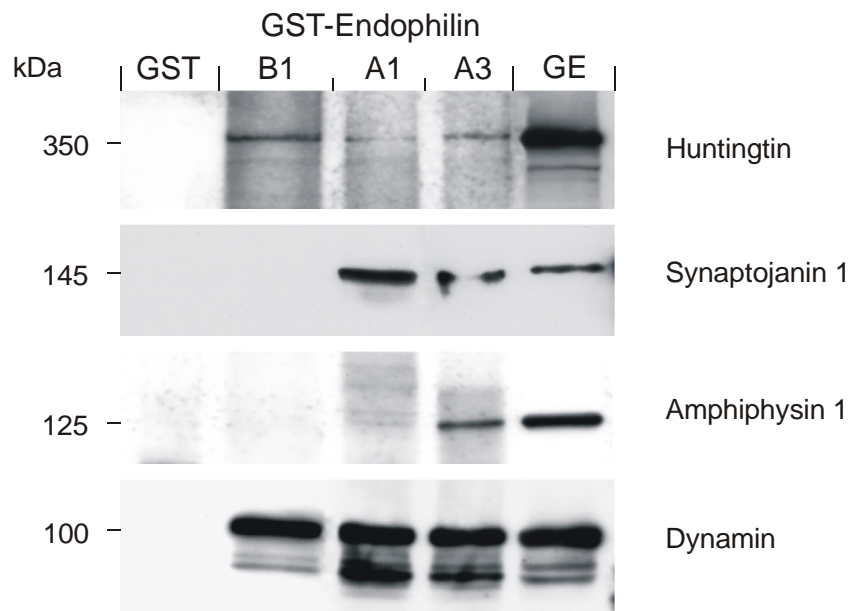


Abbildung 4-22. Bindungspartner von Endophilin B1 im Vergleich zu Endophilin A1 und A3. Die Bindungspartner der Endophiline wurden aus Maushirn-Gewebeextrakt (GE) mit Hilfe von immobilisierten GST-Endophilin-Fusionsproteinen präzipitiert („Pull down“) und durch Western Blot nachgewiesen. Dynamin und Huntingtin sind gemeinsame Interaktionspartner von allen drei untersuchten Endophilinen. Endophilin B1 bindet jedoch im Gegensatz zu den Endophilinen A1 und A3 nicht an Synaptojanin 1 und Amphiphysin 1.

Als Bindungspartner von Endophilin B1 konnten die bekannten Bindungspartner von Endophilin A1 und Endophilin A3, Dynamin und Huntingtin, nachgewiesen werden. Bisher ebenfalls nicht bekannt war die Interaktion von Endophilin A1 mit Huntingtin. Die synaptischen Proteine Synaptojanin 1 und Amphiphysin 1 scheinen jedoch nur an Mitglieder der Endophilin A-Familie zu binden, da keine Interaktion mit Endophilin B1 detektiert werden konnte (Abbildung 4-22).

4.4.8 Intrazelluläre Lokalisierung von Endophilin B1

Die intrazelluläre Verteilung von Endophilin B1 wurde anhand transfizierter Zellen analysiert, da die Endophilin B1-spezifischen Antikörper nur die hirnspezifisch gespleißte Isoform hinreichend erkennen. 24-48 Stunden nach Transfektion von NIH 3T3 Fibroblasten mit Vektoren zur Expression von HA-Endophilin B1-Fusionsprotein wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurde Endophilin B1 mit HA-tag-spezifischen Primärantikörpern und parallel weitere Proteine mit ihren jeweils spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

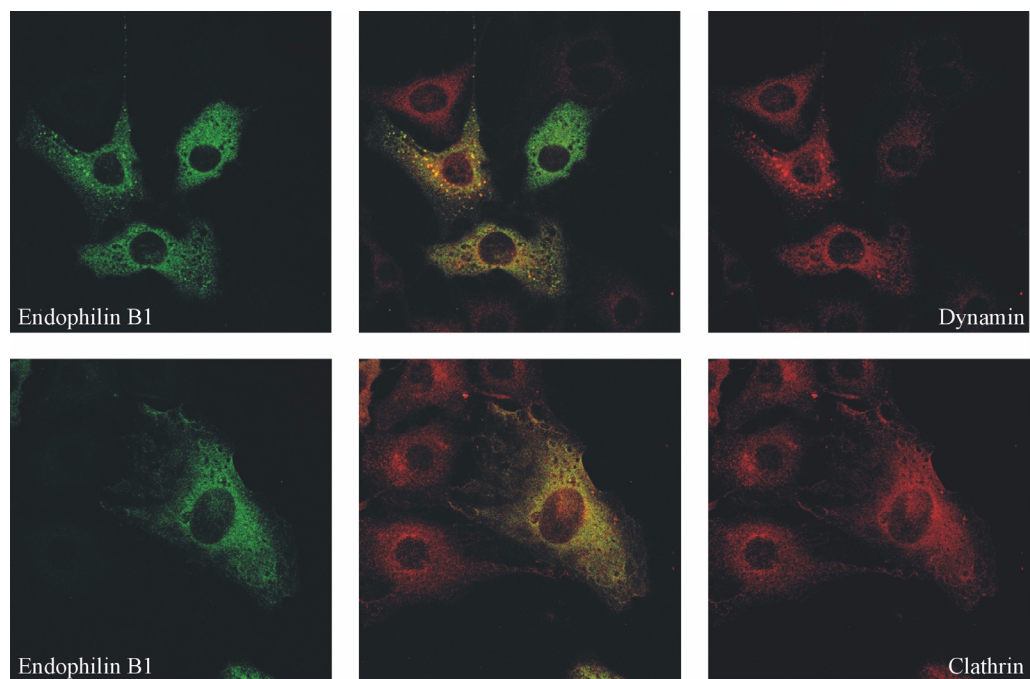


Abbildung 4-23. Intrazelluläre Lokalisation von Endophilin B1. HA-Endophilin B1 überexprimierende NIH 3T3 Fibroblasten wurden parallel gegen HA-Endophilin B1 und Dynamin bzw. Clathrin gefärbt und mittels konfokaler Laserfluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen.

Endophilin B1 zeigt in überexprimierenden Zellen eine intrazelluläre, Vesikel-ähnliche Verteilung, jedoch kann an der Plasmamembran kein Endophilin B1 nachgewiesen werden (Abbildung 4-23). Die Überlagerung der Färbungen von Endophilin B1 und Dynamin weist auf eine deutliche Kolokalisierung der beiden Proteine hin. Ebenso kann in HA-Endophilin B1-überexprimierenden Zellen eine Kolokalisation mit Clathrin detektiert werden, so daß Endophilin B1 vermutlich an der intrazellulären Abschnürung clathrinumhüllter Vesikel beteiligt ist.

4.4.9 Einfluß von Endophilin B1 auf clathrinvermittelte Endozytose

Da Endophilin B1 in Immunfluoreszenzaufnahmen keine Lokalisierung an der Plasmamembran besaß, sollte untersucht werden, ob Endophilin B1 an der clathrinvermittelten Endozytose beteiligt ist.

Ein geeignetes Modellsystem zur Analyse der clathrinvermittelten Endozytose ist die Endozytose des Transferrin-Rezeptors. Der Transferrin-Rezeptor dient der Zelle zur Aufnahme von Eisen-Ionen über einen Eisen-Transferrin-Komplex. Verwendet man fluoreszenzmarkiertes Transferrin, kann man die Menge des aufgenommenen Transferrins mit Hilfe von Durchflußzytometrie bestimmen.

Für die Durchflußzytometrie wurde der kodierende Bereich von Endophilin B1 so in einen Expressionsvektor kloniert, daß es ein durchgehendes Leseraster mit der cDNA des rot fluoreszierenden Proteins DsRed bildet. Parallel zur Transferrin-Aufnahme wird dann in der Durchflußzytometrie das in der jeweiligen Zelle überexprimierte DsRed-Endophilin B1-Fusionsprotein detektiert. Zur Kontrolle wurde DsRed allein sowie PACSIN 1 und PACSIN 3 verwendet, von denen der inhibierende Einfluß auf die clathrinvermittelte Endozytose zuvor gezeigt worden war (Qualmann *et al.*, 1998; Modregger *et al.*, 2000).

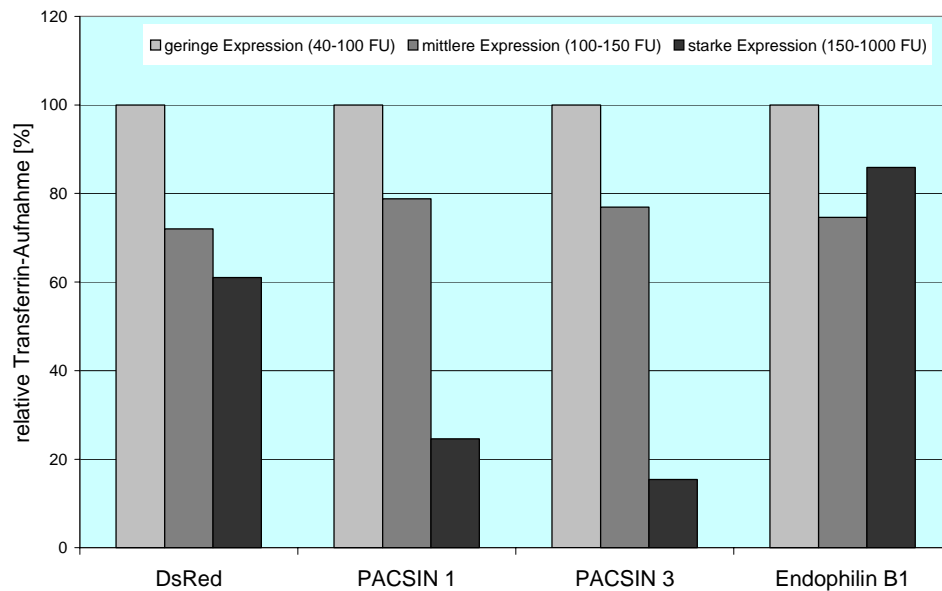


Abbildung 4-24. Endophilin B1 hat keinen Einfluß auf die clathrinvermittelte Endozytose. Zur Quantifizierung der clathrinvermittelten Endozytose wurden DsRed-Fusionsproteine überexprimierende NIH 3T3 Zellen mit FITC-markiertem Transferrin inkubiert und die Aufnahme des Transferrins mittels Durchflußzytometrie detektiert. Die Überexpression von DsRed-Endophilin B1 in den Zellen inhibiert die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Transferrin nicht, während die Fusionsproteine DsRed-PACSIN 1 und DsRed-PACSIN 3 bei starker Überexpression (150-1000 Fluoreszenzeinheiten (FU)) die Transferrin-Aufnahme inhibieren. Die Transferrin-Aufnahme schwach transfizierter Zellen (40-100 FU) wurde zur einfacheren Darstellung der Daten jeweils auf 100 % normalisiert.

Endophilin B1 zeigt keine Inhibition der Transferrin-Aufnahme im Gegensatz zu PACSIN 1 und PACSIN 3 (Abbildung 4-24). Auch bei starker Überexpression der DsRed-Fusionsproteine zeigt sich bei Endophilin B1-Überexpression keine signifikante Änderung der clathrinvermittelten Endozytose, während PACSIN 1 und PACSIN 3 (150-1000 Fluoreszenzeinheiten) im Vergleich zur Negativkontrolle DsRed die Transferrin-Aufnahme über Clathrin-Vesikel um 60-75 % reduzieren.

4.5 Identifikation weiterer PACSIN 1-Interaktionen

Zur Identifikation weiterer unbekannter Bindungspartner wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt. Möchte man die Interaktion zweier bekannter Proteine überprüfen, und ist eines der Proteine in größeren Mengen aufgereinigt vorhanden, so steht die Methode der Affinitätschromatographie mit matrixgekoppelten Proteinen zur Verfügung, die mit Proteinextrakten inkubiert werden. Nach ausgiebigem Waschen werden dann gebundene Proteine eluiert und analysiert. Bekannte Interaktionspartner können durch Western Blot-Analysen nachgewiesen werden, während vollständig unbekannte Proteine, gegen die keine spezifischen Antikörper vorhanden sind, durch Sequenzierung identifi-

ziert werden müssen. Wird die Matrix nicht in Säulen gepackt, sondern in die Lösung der potentiellen Bindungspartner gegeben und später durch Zentrifugation abgetrennt, spricht man von einer Präzipitation oder auch „Pull down“.

Unbekannte Bindungspartner lassen sich auf Proteinebene nur schwer identifizieren. Eine Methode, um eine Größenabschätzung der Bindungspartner vornehmen zu können, ist die Wechselwirkung von in Lösung befindlichen Proteinen mit auf Membranen immobilisierten Proteinextrakten („Overlay assay“).

Hierzu wird ein Proteinextrakt mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine geeignete Membran transferiert. Der Nachweis der Interaktion erfolgt nun durch eine Inkubation („Overlay“) mit gereinigtem Protein oder Gewebeextrakten, so daß die bekannten Proteine aus der flüssigen Phase an die immobilisierten Proteine binden können. Anschließend werden die bekannten Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und ergeben Banden auf der Laufhöhe der unbekannten Bindungspartner.

4.5.1 Unbekannte PACSIN 1-bindende Proteine

Zum Nachweis von noch unbekannten Interaktionspartnern von PACSIN 1 wurde eine zuvor erläuterte „Overlay“-Analyse durchgeführt. Maushirn-Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die einzelnen Spuren der Membran wurden mit Proteinextrakten mit bzw. ohne PACSIN 1 inkubiert. An die membrangekoppelten Proteine gebundenes PACSIN 1 wurde mit PACSIN 1-spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Für PACSIN 1 zeigte sich in dieser Form des Protein-Protein-Interaktionsnachweises unter anderem eine spezifische Bande bei ca. 350 kDa. Da viele der Endophilin-bindenden Proteine auch mit den PACSIN-Proteinen interagieren und für diese Laufhöhe Huntingtin als Endophilin A3-Interaktionspartner bekannt war (Sittler *et al.*, 1998), wurde die Membran mit den Proteinextrakten erneut mit Huntingtin-spezifischen Antikörpern umgesetzt. Die Huntingtin-Antikörper wiesen eine Bande exakt auf der gleichen Laufhöhe wie im PACSIN 1-„Overlay“ nach.

4.5.2 Charakterisierung der PACSIN 1-Huntingtin Interaktion

Zur Verifizierung und näheren Charakterisierung der Interaktion von Huntingtin mit PACSIN 1 wurde ein „Pull down“-Experiment mit Maushirn-Gewebeextrakten durchgeführt.

Deletionsmutanten von PACSIN 1 wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert, aufgereinigt und an Glutathion-Sepharose 4B immobilisiert. Die an die Matrix gebundenen GST-

PACSIN 1-Fusionsproteine wurden mit Gewebeextrakten aus Gehirn inkubiert und anschließend sorgfältig gewaschen. Die gebundenen Hirn-Proteine wurden mit SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert, durch SDS-PAGE größenfraktioniert und auf eine PVDF-Membran elektrophoretisch übertragen.

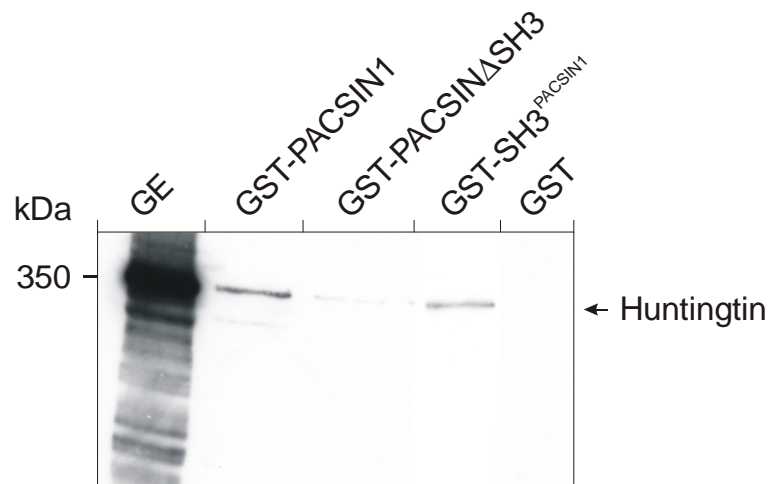


Abbildung 4-25. PACSIN 1 bindet an Huntingtin. In einem „Pull down“-Experiment wurde Huntingtin spezifisch mit immobilisiertem GST-PACSIN 1 und GST-SH3^{PACSIN1}-Fusionsproteinen aus Maushirn-Gewebeextrakten (GE) präzipitiert und mittels Western Blot und Huntingtin-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die SH3-Deletionsmutante GST-PACSIN 1ΔSH3 und die Kontrolle GST binden nicht an Huntingtin.

Der Nachweis von Huntingtin erfolgte mit Huntingtin-spezifischen monoklonalen Antikörpern. Sowohl PACSIN 1 voller Länge als auch die separate SH3-Domäne von PACSIN 1 (GST-SH3^{PACSIN1}) präzipitierten Huntingtin (Abbildung 4-25). Das um die SH3-Domäne verkürzte PACSIN 1 (GST-PACSIN 1ΔSH3) interagiert wie GST als Negativkontrolle nicht mehr mit Huntingtin.

4.5.3 Two-Hybrid-Analyse der PACSIN 1-Huntingtin-Interaktion

Für die weiteren Analysen der Interaktionen zwischen Huntingtin und PACSIN 1 wurde die kodierende Region von Exon 1 des Huntingtin-Gens mittels PCR amplifiziert, da mehrere Untersuchungen bereits gezeigt haben, daß die von Exon 1 kodierte prolinreiche Sequenz für die Interaktion mit SH3-Domänen verantwortlich ist und schon die Expression des mutierten Exon 1-Proteins zu HD-ähnlichen Phänotypen in Zellen wie auch in transgenen Mausmodellen führt (Mangiarini *et al.*, 1996; Schilling *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2000).

Nach der Isolierung von genomischer DNA aus humanen Gewebeproben (Striatum) wurde diese als Matrice in einer PCR-Reaktion mit den Huntingtin-Exon 1-spezifischen Oligonukleotiden hHDsATGno1(Bam HI) und hHDasEX1(Bam HI/Eco RI) eingesetzt.

Diese Oligonukleotide führten am Anfang und am Ende der kodierenden Exon 1-DNA-Sequenz Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen EcoR I und BamH I ein, um die entstehenden PCR-Fragmente leichter subklonieren zu können. Nach der Klonierung der Huntingtin-Exon 1-cDNA in das Plasmid pACT2 und der Kotransformation mit pAS2-1/PACSIN 1-Plasmiden in Y190 Hefen wurde nach fünf Tagen die Aktivierung der Reportergene (HIS3, LacZ) untersucht (Tabelle 4-5).

pAS2-1	pACT2	
	---	Huntingtin
---	-	-
PACSIN 1	-	++
PACSIN 1P434L	-	-
PACSIN 1 Δ SH3	-	-

Tabelle 4-5. Two-Hybrid-Analyse der Bindung von PACSIN 1 an Huntingtin. PACSIN 1 voller Länge, PACSIN 1 mit der SH3-inaktivierenden P434L-Mutation sowie die Deletionsmutante ohne SH3-Domäne wurden im Two-Hybrid-System auf eine Aktivierung der Reportergene mit Huntingtin getestet. Nur PACSIN 1 mit intakter SH3-Domäne interagiert mit Huntingtin. Als Negativkontrolle dienten die Plasmide pAS2-1 und pACT2 ohne zusätzlich inserierte cDNAs (++, starkes Wachstum, Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test nach 2-4 h; -, kein oder nur geringes Wachstum, keine Blaufärbung nach 8 h).

Sowohl die SH3-Deletionsmutante als auch das durch die P434L-Punktmutation inaktivierte PACSIN 1 voller Länge interagierten nicht mehr mit dem Huntingtin-Exon 1-Protein. Ausschließlich PACSIN 1 mit intakter SH3-Domäne zeigte eine Interaktion mit Huntingtin (Tabelle 4-5).

4.5.4 Spezifität der PACSIN 1-Huntingtin-Interaktion

Da alle bisher untersuchten PACSIN 1-bindenden Proteine auch mit den weiteren Familienmitgliedern PACSIN 2 und 3 interagieren, wurde auch untersucht, ob Huntingtin-Exon 1-Protein an alle Proteine der PACSIN-Familie bindet.

Für PACSIN 2 und 3 ließ sich jedoch keine Interaktion mit Huntingtin nachweisen. Damit ist Huntingtin der erste SH3-bindende Interaktionspartner der PACSIN-Familie, der isoformspezifisch ausschließlich an PACSIN 1 bindet (Tabelle 4-6).

pAS2-1	pACT2	
	---	Huntingtin
---	-	-
PACSIN 1	-	++
PACSIN 2	-	-
PACSIN 3	-	-

Tabelle 4-6. Analyse der Two-Hybrid-Interaktionen von Huntingtin mit PACSIN 1, 2 und 3. Von den drei Mitgliedern der PACSIN-Familie interagierte im Two-Hybrid-System nur PACSIN 1 mit Huntingtin-Exon 1-Protein (++, starkes Wachstum, Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test nach 2-4 h; -, kein oder nur schwaches Wachstum, keine Blaufärbung nach 8 h)

4.5.5 Zusammenfassung der PACSIN 1-Huntingtin-Interaktion

Mit Hilfe proteinchemischer Methoden konnte als weiterer, bisher unbekannter Bindungspartner von PACSIN 1 das 350 kDa große Protein Huntingtin identifiziert und anschließend mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems verifiziert werden. Die Interaktion erfolgt über die PACSIN 1-SH3-Domäne und die prolinreiche Region des aminoterminalen Bereichs von Huntingtin, die von Exon 1 des Huntingtin-Gens kodiert wird. Auffallend ist insbesondere, daß Huntingtin spezifisch mit der SH3-Domäne von PACSIN 1 interagiert, obwohl die SH3-Domänen aller PACSIN-Proteine hoch konserviert sind. Alle weiteren bekannten und hier identifizierten SH3-Bindungspartner sind nicht isoformspezifisch, sondern binden an alle drei PACSIN-Familienmitglieder.

Huntingtin als Bindungspartner von PACSIN 1 löst die progressive neurodegenerative Erkrankung *Chorea Huntington* aus, wenn die aminoterminal Polyglutamin-Region pathologisch verlängert ist. Ein Zusammenhang der Huntingtin-PACSIN 1-Interaktion mit dieser Erkrankung ist zu vermuten, weil die PACSIN 1-Expression bei neurodegenerativen Verletzungen wie entorhinalen Kortexläsionen differentiell reguliert wird (Plomann *et al.*, 1998). Desweiteren könnte Huntingtin aufgrund seiner vesikulären intrazellulären Verteilung an der Bildung und dem Transport von Vesikeln beteiligt sein (DiFiglia *et al.*, 1995), so daß die Charakterisierung der Interaktion mit PACSIN 1 näheren Aufschluß über die physiologische Funktion beider Proteine und über die Pathogenese von *Chorea Huntington* liefern könnte.

4.6 PACSIN 1 und Endophilin B1 in *Chorea Huntington*

In der neurodegenerativen Erkrankung *Chorea Huntington* ist das erste Exon des Huntingtin-Gens mutiert. Eine CAG-Wiederholungsregion, die für eine Polyglutamin-Region

kodiert, ist von durchschnittlich 16-18 CAG-Wiederholungen auf mehr als 36 Wiederholungen verlängert (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Basierend auf den zuvor beschriebenen Ergebnissen stellt sich die Frage, in welcher Weise sich pathologisches Huntingtin mit verlängerter Polyglutamin-Wiederholung auf die Interaktion mit PACSIN 1 bzw. Endophilin B1 auswirkt.

Einerseits könnten die Interaktionen zwischen PACSIN 1 bzw. Endophilin B1 mit Huntingtin die im progressiven Verlauf der Erkrankung auftretenden pathologischen Veränderungen auslösen („gain-of-function“-Modell), die in keinem Zusammenhang mit der Funktion der Proteine in nicht betroffenen Individuen stehen. Andererseits könnte die natürliche Funktion dieser Interaktionen durch die Mutation inhibiert werden und somit wichtige sekundäre Effekte verursachen („loss-of-function“-Modell).

Da die physiologische Funktion von Huntingtin nicht bekannt ist und sich der komplexe neuropathologische Verlauf von *Chorea Huntington* noch nicht erklären läßt, sind weitere Untersuchungen zu den Interaktionen von PACSIN 1 und Endophilin B1 mit Huntingtin erforderlich.

4.6.1 Klonierung von pathologischem Huntingtin

Zur Untersuchung der Interaktionen von PACSIN 1 und Endophilin B1 mit mutiertem Huntingtin wurde die Exon 1-DNA eines pathologischen Huntingtin-Allels analog zum Wildtyp mittels PCR amplifiziert.

Für das Kontrollgewebe wurde eine einzelne Bande von 295 bp nachgewiesen, während die PCR mit genomischer DNA aus HD-Patientengewebe (R2-175, freundlicherweise vom Referenzzentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, München zur Verfügung gestellt) zwei Banden aufwies (298 bp, 364 bp, Abbildung 4-26).

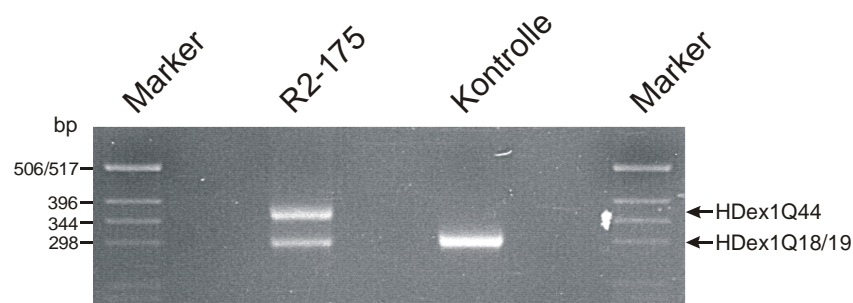


Abbildung 4-26. Elektrophoretische Analyse der Huntingtin-Exon 1-PCR mit genomischer DNA als Matrize. In genomischer DNA aus Patientengewebe (R2-175) wurde Huntingtin mit 18 und 44 CAG-Wiederholungen nachgewiesen.

Die Klonierung dieser Fragmente erfolgte über BamH I in den Hefe-Expressionsvektor pACT2. Die anschließende Sequenzierung ergab für das mutierte Allel 44 CAG-Wiederholungen bzw. für das exprimierte Protein 44 Glutamine, für die nicht betroffenen Allele 18 bzw. 19 CAG-Wiederholungen.

4.6.2 Two-Hybrid-Bindungsstudien

Mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems wurde untersucht, ob die beiden Proteine PACSIN 1 und Endophilin B1 auch mit pathologisch verlängertem Huntingtin interagieren. Hierzu wurden Huntingtin-Two-Hybrid-Konstrukte mit 18 und 44 Glutaminen mit pAS2-1/PACSIN 1 bzw. pAS2-1/Endophilin B1 in Y190 Hefen kotransformiert und die Aktivierung des HIS3- und des LacZ-Reportergens nach fünf Tagen analysiert.

pAS2-1	pACT2		
	---	HDex1Q18	HDex1Q44
---	-	-	-
PACSIN 1	-	++	++
Endophilin B1	-	++	++

Tabelle 4-7. Two-Hybrid-Analyse der Interaktion von PACSIN 1 und Endophilin B1 mit Huntingtin-Exon 1-Protein. PACSIN 1 und Endophilin B1 interagierten im Two-Hybrid-System sowohl mit Wildtyp-Huntingtin mit 18 Glutaminen (HDex1Q18) als auch mit mutiertem Huntingtin mit 44 Glutaminen (HDex1Q44; ++, starkes Wachstum, Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test nach 2-4 h; -, kein oder nur geringes Wachstum, keine Blaufärbung nach 8 h).

PACSIN 1 interagiert mit beiden Huntingtin-Formen und aktiviert die Reportergene stark, so daß schon nach zwei Stunden eine blaue Färbung im β -Galaktosidase-Test nachgewiesen werden konnte (Tabelle 4-7). Für Endophilin B1 zeigte sich ebenfalls, daß sowohl das pathologisch verlängerte Huntingtin-Exon 1-Protein als auch das nicht mutierte Huntingtin in der Lage waren, mit Endophilin B1 zu interagieren (Tabelle 4-7).

4.6.3 Einfluß der Polyglutamin-Länge auf die Interaktionen

Um zu klären, ob pathologisch verlängertes Huntingtin eine veränderte Bindung an PACSIN 1 bzw. Endophilin B1 aufweist, wurden die Interaktionen mit Flüssigkultur- β -Galaktosidase-Analysen und ONPG als Substrat untersucht. Hierzu wurden Y190 Hefen mit den jeweiligen Plasmiden pAS2-1/PACSIN 1 oder pAS2-1/Endophilin B1 und pACT2/HDex1Q44 transformiert und die Aktivierung des LacZ-Reportergens durch Messung der β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Zur Kontrolle wurde Huntingtin-Exon 1-Protein mit 18 Glutaminwiederholungen eingesetzt (pACT2/HDex1Q18). Die

Werte für die Interaktion der nicht mutierten Proteine wurde zur besseren Analyse der Daten auf 100 normalisiert, so daß die Änderungen der Interaktionen von PACSIN 1 bzw. Endophilin B1 mit mutiertem Huntingtin leicht ersichtlich sind.

Es zeigte sich, daß die Interaktion von PACSIN 1 mit pathologischem Huntingtin-Exon 1-Protein mit 44 Glutaminen die Reporterogenaktivität im Vergleich zu nicht mutiertem Huntingtin-Exon 1-Protein mit 18 Glutaminen verdoppelt (Abbildung 4-27).

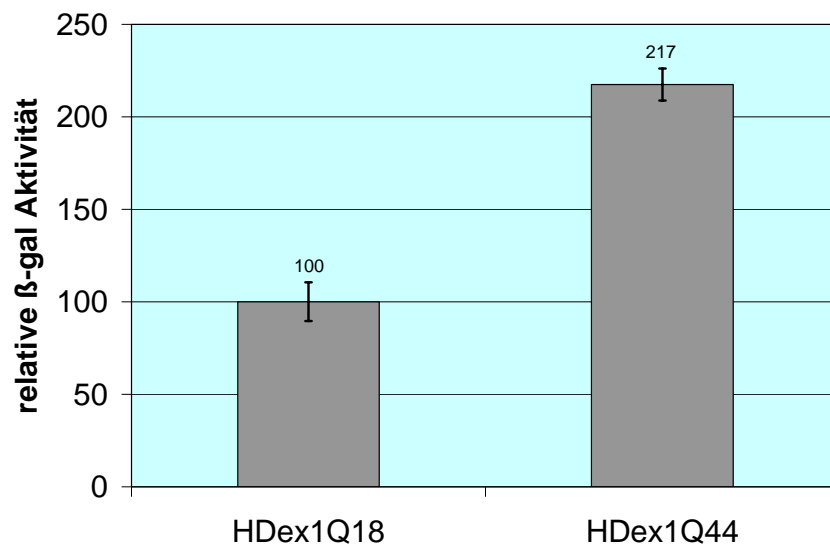


Abbildung 4-27. Veränderung der PACSIN 1-Huntingtin-Interaktion in Abhängigkeit von der Glutaminanzahl. Die Aktivierung des LacZ-Reportergens durch PACSIN 1 mit Huntingtin-Exon 1-Protein mit 18 Glutaminen (HDex1Q18) wurde auf 100 normalisiert und mit der β -Galaktosidase-Aktivierung durch PACSIN 1 und Huntingtin-Exon 1-Protein mit 44 Glutaminen (HDex1Q44) verglichen.

Im Fall von Endophilin B1 reduziert die Interaktion mit mutiertem Huntingtin-Exon 1-Protein die Reporterogenaktivität im Vergleich zu nicht betroffenem Huntingtin auf 44 % (Abbildung 4-28). Endophilin B1 verhält sich daher entgegengesetzt zu PACSIN 1 (Abbildung 4-27) und Endophilin A3 (Sittler *et al.*, 1998).

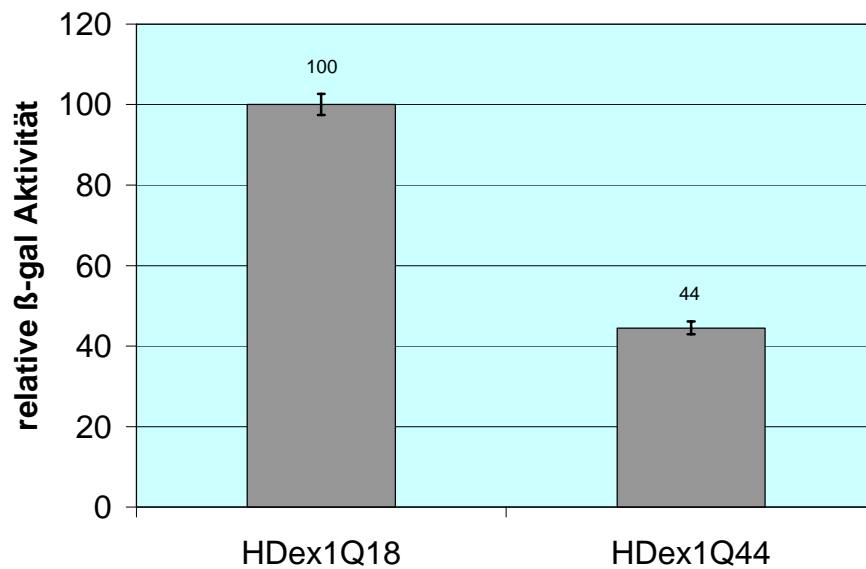


Abbildung 4-28. Veränderung der Endophilin B1-Huntingtin-Interaktion in Abhängigkeit von der Glutaminanzahl. Die β -Galaktosidase-Aktivität durch die Interaktion von Endophilin B1 mit Huntingtin-Exon 1-Protein mit 18 Glutaminen (HDex1Q18) wurde auf 100 normalisiert und mit der β -Galaktosidase-Aktivität der mit Endophilin B1 und Huntingtin-Exon 1-Protein mit 44 Glutaminen (HDex1Q44) transformierten Hefen verglichen.

4.6.4 PACSIN 1-Interaktionen in pathologischem Gewebe

Da PACSIN 1 stärker an pathologisches als an nicht mutiertes Huntingtin bindet, wurden die Interaktionen von PACSIN 1 mit weiteren Proteinen in gesundem und pathologischem Gewebe untersucht. Mit Hilfe der „Overlay“-Technik wurden die Interaktionspartner von PACSIN 1 in Gewebeextrakten aus gesundem und pathologischem humanem Striatum nachgewiesen, so daß Unterschiede im Bindungsverhalten oder der Expression der Bindungspartner detektiert wurden.

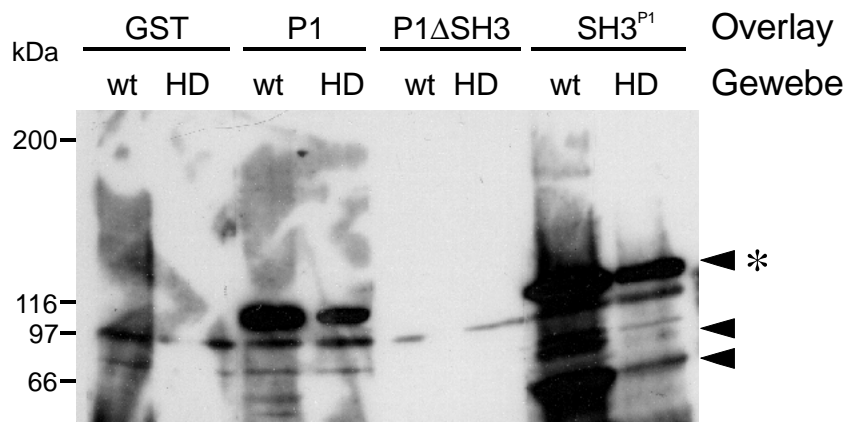


Abbildung 4-29. PACSIN 1-Interaktionen in gesunden (wt) und pathologischen (HD) Striatum-Extrakten. Gewebeextrakte wurden auf PVDF-Membran geblottet und mit GST-PACSIN 1 (P1), GST-PACSIN 1 Δ SH3 (P1 Δ SH3) und GST-SH3^{PACSIN 1} (SH3^{P1}) Fusionsproteinen sowie zur Kontrolle mit GST inkubiert („Overlay“). Gebundene Proteine wurden mit PACSIN 1-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Spezifische Banden wurden mit einem Pfeil markiert. Die 100 kDa Bande (*) ist vermutlich Dynamin zuzuordnen.

Der Interaktionspartner von PACSIN 1 mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 100 kDa (*) stellte sehr wahrscheinlich Dynamin dar, das keine deutlichen Veränderungen in *Chorea Huntington*-Gewebe zeigte (Abbildung 4-29). Weitere Bindungspartner der SH3-Domäne von PACSIN 1 schienen jedoch in pathologischen Gewebeextrakten stark reduziert mit PACSIN 1 zu interagieren (P1; SH3^{P1}). Besonders auffallend waren die Veränderungen einer 76 kDa-Bande, die eine Synapsin-Isoform darstellen könnte (Petrucci und Morrow, 1987), und einer 65 kDa-Bande, die der Laufhöhe von N-WASP entspricht (Miki *et al.*, 1996). Diese SH3-spezifischen Interaktionen wurden mit der SH3-Deletionsmutante von PACSIN 1 (P1 Δ SH3) nicht detektiert.

4.6.5 Nachweis von PACSIN 1 in *Chorea Huntington*-Gewebeschnitten

In Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr. Danilo Tagle (NIH, Bethesda, USA) wurden mit PACSIN 1-spezifischen Antikörpern Hirnschnitte gefärbt, um eventuelle Veränderungen der PACSIN 1-Lokalisation in *Chorea Huntington* nachzuweisen. Es wurden Gewebeschnitte aus humanem frontalen Kortex von *Chorea Huntington*-Patienten in der Frühphase der Erkrankung (HD Phase 1) mit Kontrollgeweben aus nicht von HD betroffenen Individuen verglichen (Abbildung 4-30).

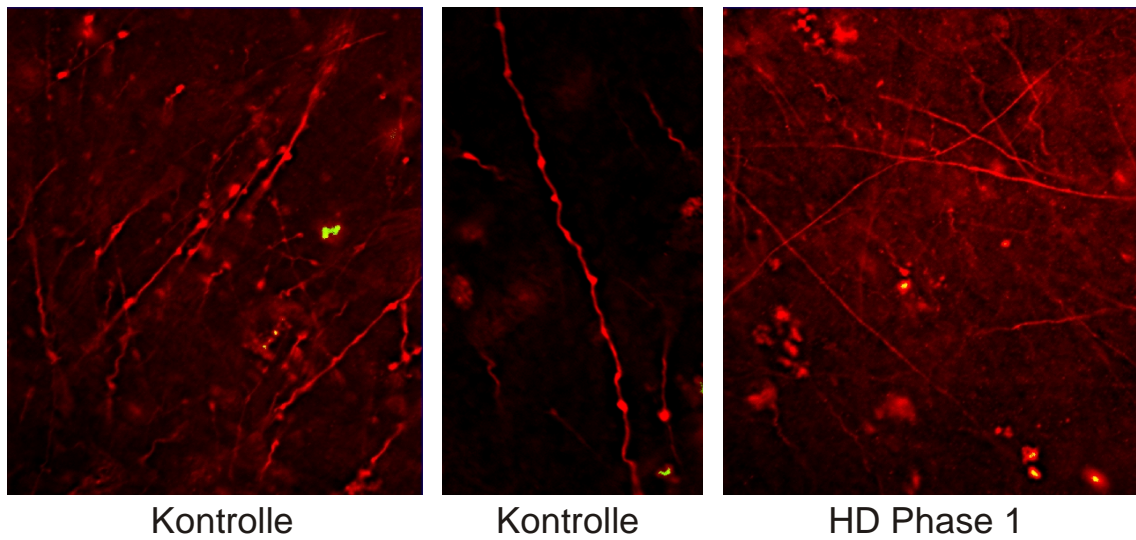


Abbildung 4-30. PACSIN 1 im vorderen Kortex. In gesundem Gewebe befand sich PACSIN 1 unter anderem auch in den synaptischen Verdickungen der Neuriten („boutons“, siehe Kontrollen). Schon in der frühen Phase der Erkrankung ließ sich PACSIN 1 dort nicht mehr nachweisen, sondern zeigte eine lineare Verteilung entlang der Neuriten (HD Phase 1).

PACSIN 1 war in den gesunden Geweben (Kontrollen) in den Neuriten und synaptischen Verdickungen („boutons“) lokalisiert. Im pathologischen Gewebe aus *Chorea Huntington*-Patienten in einer frühen Phase der Erkrankung wies PACSIN 1 nur noch eine lineare Verteilung entlang der Neuriten auf (Abbildung 4-30, HD Phase 1).

4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bisher unbekannte PACSIN 1-bindende Proteine identifiziert und genauer charakterisiert. Die Bindungsmotive der mit Hilfe eines Two-Hybrid-Screens identifizierten Bindungspartner von PACSIN 1 wurden durch Deletions- und Punktmutanten untersucht.

Die meisten der neu identifizierten Interaktionsspartner interagieren mit PACSIN 1 in der aminoterminalen Region, Klon 26-14 bindet an die NPF-Motive und die Klone 18-1, 42-14 und 48-9 an die SH3-Domäne. Im Hinblick auf die große Bedeutung von SH3-Interaktionen in vielen zellulären Vorgängen wurden die PACSIN 1-SH3-bindenden Proteine 18-1, 42-14 und 48-9 weiter untersucht. Vor den weiteren Analysen wurde mit Hilfe von EST-Klonen, der Isolierung weiterer cDNA-Klone aus cDNA-Banken und RACE sichergestellt, daß die jeweilige cDNA-Sequenz der Klone vollständig vorhanden war.

Das hirnspezifisch exprimierte Protein 18-1 besteht zu 20,6 % aus Prolinen und dient vermutlich als Adapterprotein für verschiedene SH3-Proteine. Erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Klon 18-1 am nukleozytosolischen Transport ergaben sich aus der teilweise zytoplasmischen, teilweise nukleären Lokalisation des Proteins in überexprimierenden Zellen. Die Interaktion mit Klon 42-14 (P140) konnte auf proteinchemischem Wege nicht bestätigt werden. Auch Klon 48-9 (Endophilin B1) interagiert *in vivo* nicht mit PACSIN 1, da die SH3-bindende prolinreiche Region im Two-Hybrid-System artifiziell translatiert wird. Jedoch ist die mit 48-9 verwandte Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase Endophilin A1 wie PACSIN 1 auch an der clathrinvermittelten Endozytose synaptischer Vesikel beteiligt, so daß Endophilin B1 als potentiell endozytotisches Protein weiter analysiert wurde. Endophilin B1 wies als Mitglied einer neuen Endophilin-Subfamilie zwar auch Acyl-Transferase-Aktivität auf, hat jedoch nicht an die endozytotischen Proteine Synaptojanin 1 und Amphiphysin 1 gebunden, die gemeinsame Bindungspartner der Endophiline A1, A2 und A3 darstellen. In Übereinstimmung hiermit zeigte Endophilin B1 keinen Einfluß auf die clathrinvermittelte Endozytose des Transferrin-Rezeptors in NIH 3T3 Fibroblasten.

Da sowohl PACSIN 1 als auch Endophilin B1 mit Huntingtin interagierten, wurden diese Interaktionen genauer charakterisiert. Huntingtin kann in pathologisch verlängerter Form die progressive neurodegenerative Erkrankung *Chorea Huntington* auslösen. Es zeigte sich, daß PACSIN 1 an mutiertes Huntingtin stärker bindet als an Wildtyp-Huntingtin, während Endophilin B1 mit mutiertem Huntingtin schwächer interagiert. In Neuronen des frontalen Kortex wies PACSIN 1 eine lineare Verteilung entlang der Neuriten auf. Zusätzlich war PACSIN 1 auffallend an synaptischen Verdickungen („boutons“) konzentriert, in denen es in pathologischem Gewebe nicht mehr nachzuweisen war. Das endozytotische Protein PACSIN 1 ist daher sehr wahrscheinlich an der Pathogenese von *Chorea Huntington* beteiligt.

5 Diskussion

5.1 Bindungspartner von PACSIN 1

Neben den Two-Hybrid-Bindungspartnern 47-9 (Kinectin) und 48-9 (Endophilin-ähnlich; Modregger, 1997) ließen die Bindungspartner Dynamin 1, Synaptojanin 1 und Synapsin des PACSIN 1-Rattenhomologs Syndapin (Qualmann *et al.*, 1999) vermuten, daß PACSIN 1/Syndapin an der Endozytose oder dem Transport synaptischer Vesikel beteiligt ist, geben jedoch keinen Aufschluß über die genaue Funktion von PACSIN 1. Genauere Analysen zeigten, daß die SH3-Domänen der PACSIN-Proteine die Aufnahme des Transferrin-Rezeptors inhibieren und die PACSIN-Proteine somit direkten Einfluß auf die clathrinvermittelte Endozytose nehmen (Qualmann *et al.*, 1999; Modregger *et al.*, 2000). N-WASP als weiterer Bindungspartner ist an der Regulation des Actin-Zytoskeletts beteiligt, so daß PACSIN-Proteine die clathrinvermittelte Endozytose und den Vesikel-Transport mit Reorganisationen des Actin-Zytoskeletts verknüpfen könnten.

Mit Hilfe eines Two-Hybrid-Screens wurden bisher unbekannte Bindungspartner von PACSIN 1 identifiziert (Modregger, 1997). Die meisten dieser Two-Hybrid-Bindungspartner waren zu diesem Zeitpunkt nicht funktionell charakterisiert, so daß erst durch weitere Untersuchungen dieser Interaktionen Hinweise auf die Funktion von PACSIN 1 zu erzielen waren.

Hierzu wurden die Bindungsmotive in PACSIN 1 durch Deletions- und Punktmutanten analysiert. Mehrere Klone interagierten mit den carboxyterminalen Protein-Protein-Interaktionsmotiven. Die Klone 18-1, 42-14, und 48-9 enthielten prolinreiche Motive, die mit der SH3-Domäne von PACSIN 1 interagierten. Der Klon 26-14 mit Ähnlichkeit zu dem *Drosophila*-Protein PAST besitzt eine carboxyterminale EH-Domäne, die an die NPF-Motive von PACSIN 1 bindet. Alle weiteren Klone interagierten noch mit der kürzesten Deletionsmutante von PACSIN 1, die die Aminosäuren 1-284 und damit die aminoterminalen CDC15NT-Region umfaßte.

Sequenzvergleiche ergaben, daß der SH3-bindende Klon 48-9 Ähnlichkeit zu den Endophilinen aufweist. Die Endophilinen sind ebenfalls aktiv an der Abschnürung clathrinumhüllter Vesikel beteiligt, so daß die Charakterisierung von Klon 48-9 einen Beitrag zum weiteren Verständnis der clathrinvermittelten Vesikelbildung liefern könnte. Desweiteren konnte durch proteinchemische Experimente die Bindung von Klon 18-1 an PACSIN 1 verifiziert werden und Huntingtin als weiterer Bindungspartner der PACSIN 1-SH3-Domäne identifiziert werden. Eine pathologisch verlängerte Huntingtin-Form verursacht *Chorea Huntington*, eine tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankung. Die Cha-

rakterisierung der Interaktion von PACSIN 1 mit Huntingtin könnte daher sowohl der weiteren Aufklärung der Pathogenese in *Chorea Huntington*-Patienten dienen, als auch die noch unbekannte Funktion Huntingtins in Endozytose und Vesikeltransport aufklären helfen.

Die weiteren Analysen fokussierten sich daher auf die Klone 18-1, 48-9 und Huntingtin, da viele bekannte SH3-Interaktionen für wichtige zelluläre Funktionen in Signalweiterleitung, Zellpolarisierung, Motilität, Transkriptionsregulation und enzymatischer Aktivierung von entscheidender Bedeutung sind. Der ebenfalls SH3-bindende Klon 42-14 wurde nicht weiter analysiert, da die Interaktion mit PACSIN 1 auf Protein-Ebene nicht bestätigt werden konnte.

5.1.1 Two-Hybrid-Klon 18-1

Der an die SH3-Domäne von PACSIN 1 bindende Klon 18-1 besaß weder Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen noch zu EST-Klonen in der Genbank. Die aus diesem Grund analysierten cDNA-Klone aus einer embryonalen Maus-cDNA-Bank ergaben, daß Klon 18-1 das vollständige offene Leseraster dieses Proteins enthielt, das für ein extrem prolinreiches Protein ohne bekannte Domänen kodiert. Das 369 Aminosäuren große Protein 18-1 enthält 76 Proline (20,6 %), die insgesamt zu 21 potentiell SH3-bindenden PXXP-Motiven gruppiert sind. Es ist daher anzunehmen, daß 18-1 als Adapterprotein an mehrere SH3-Domänen gleichzeitig binden kann und somit zur Bildung von größeren Komplexen führen kann.

Die auf Hirngewebe beschränkte Expression von 18-1 und die variable zytoplasmatische bzw. nukleäre Lokalisation des 18-1-Proteins deuten darauf hin, daß Klon 18-1 an einer neurospezifischen Regulation der PACSIN 1-Funktion beteiligt sein könnte. Eventuell ist PACSIN 1 nicht nur an der Endozytose synaptischer Vesikel beteiligt, sondern reguliert über 18-1 den nukleozytosolischen Transport. Weitere endozytotische Proteine, die ebenfalls am Export von Proteinen und RNA aus dem Zellkern über den sogenannten Rev-Export-Weg beteiligt sind, sind die Adapterproteine der Eps15-Familie (Doria *et al.*, 1999). Diese Proteine interagieren mit den Hrb-Proteinen und stimulieren synergistisch die Funktion von Rev.

Die Interaktion von PACSIN 1 mit dem prolinreichen Protein 18-1 läßt daher mehrere Interpretationsmöglichkeiten offen, ob PACSIN 1 über 18-1 an nukleozytosolischen Transportwegen beteiligt ist, oder ob 18-1 die endozytotischen Funktionen von PACSIN 1 reguliert. Die genaue Aufklärung der Funktion von 18-1 in Zusammenhang mit PACSIN 1 erfordert daher weitergehende Studien wie die Generierung und Charakterisierung von 18-1- oder PACSIN 1-Nullmutanten. Durch die Identifikation weiterer Bindungspartner von 18-1 könnte in zukünftigen Studien festgestellt werden, ob 18-1 als

SH3-bindendes Adapterprotein mehrere Proteine zu größeren Komplexen rekrutieren kann.

Die weitere Analyse von 18-1 muss jedoch auch das Verhalten von PACSIN 1 in der Erkrankung *Chorea Huntington* berücksichtigen. In dieser Erkrankung wird pathologisch verlängertes Huntingtin in den Zellkern transportiert und aggregiert dort (Davies *et al.*, 1997). Gerade an diesem bisher noch nicht genau zu erklärenden Transport des eigentlich zytosolischen Huntingtins könnte die PACSIN 1-18-1-Interaktion beteiligt sein.

5.1.2 Two-Hybrid-Klon 42-14

Der Two-Hybrid Klon 42-14 ist als 140 kDa großes Protein von L. Croci und G. G. Consalez in der Genbank veröffentlicht worden. Der an PACSIN 1 bindende Bereich von P140 weist vier prolinreiche PXXP-Motive auf, über die vermutlich die Interaktion mit den SH3-Domänen der PACSIN-Proteine stattfindet (Abbildung 4-9).

Inzwischen wurde P140 unter dem Namen SNAP-25-interacting Protein (SNIP) als Bindungspartner des Synaptosome-associated Protein von 25 kDa Molekulargewicht (SNAP-25) publiziert (Chin *et al.*, 2000). SNIP wird hirnspezifisch exprimiert und ist mit dem kortikalen Actin-Zytoskelett assoziiert. Über die Bindung an SNAP-25 reguliert SNIP die Ca^{2+} -abhängige Exozytose synaptischer Vesikel und könnte daher eine wichtige Rolle in der Regulation der Neurosekretion über die Interaktion mit SNAP-25 und dem Zytoskelett spielen.

Bedenkt man, daß PACSIN 1 über seine Interaktionen mit endozytotischen und zytoskelettalen Proteinen eine Verbindung von Endozytose und Zytoskelett-Regulation darstellt, könnte über die Interaktion von PACSIN 1 mit P140/SNIP eine übergeordnete Koordination der beiden Membranfusionsschritte in Endozytose und Exozytose stattfinden. Vor weiteren Untersuchungen in dieser Richtung muß jedoch erst die PACSIN 1-P140/SNIP-Interaktion verifiziert werden, da die Interaktion zwischen PACSIN 1 und P140 nicht mit proteinchemischen Methoden und den von L. Croci und G. G. Consalez zur Verfügung gestellten Antikörpern und Expressionsvektoren von P140 bestätigt werden konnte.

5.1.3 Endophilin B1

Der Two-Hybrid-Klon 48-9 wurde genauer analysiert, da er hohe Ähnlichkeit zu den bekannten Endophilinen besitzt, die wie die PACSIN-Proteine an der clathrinvermittelten Endozytose beteiligt sind. Das am besten untersuchte Endophilin 1 weist Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase-Aktivität auf und ist für den Ablauf der Endozytose von großer Bedeutung (Schmidt *et al.*, 1999). Es scheint an der Überleitung der frühen Phase der Membraninvagination zu den späteren Übergangszuständen von clathrinumhüllten und

mit Dynamin-Ringen versehenen tief invaginierten Membraneinstülpungen beteiligt zu sein (Ringstad *et al.*, 1999).

5.1.3.1 Sequenzanalyse von Endophilin B1

Um sicherzugehen, daß die komplette Sequenz des neuen Endophilins vorhanden war, wurden aus einer embryonalen Maus-cDNA-Bank die längsten zu Two-Hybrid-Klon 48-9 homologen Sequenzen isoliert und sequenziert. Die aus allen Klonen erhaltene cDNA-Sequenz wurde weiter untersucht und mit den bekannten Endophilinen 1, 2 und 3 sowie Einträgen aus der Genbank verglichen.

Es stellte sich heraus, daß der Two-Hybrid-Klon 48-9 neben dem kompletten offenen Leseraster des neuen Endophilins auch einen Teil der 5'-nichtkodierenden Region enthält. Die 5'-nichtkodierende Region des neuen Maus-Endophilins weist zwar keine Stop-Kodons im Leseraster des ersten Translationsstart-Kodons auf, die entsprechende humane Sequenz erhält jedoch ein Stop-Kodon, so daß es zumindest im Menschen keine aminoterminal verlängerte Form dieses Endophilins geben kann.

Die Aminosäuresequenzen der Endophiline weisen im aminoterminalen Bereich eine Region auf, der die Acyl-Transferase-Aktivität zugeschrieben wird (Schmidt *et al.*, 1999). Diese Region ist über eine Isoform-spezifische Region mit der konservierten carboxyterminalen SH3-Domäne verbunden. Vergleicht man das neue Maus-Endophilin mit den bekannten Endophilinen 1, 2 und 3, so stellt man fest, daß in der aminoterminalen LPAAT-Region einige hoch konservierte Motive vorhanden sind, die Homologie über die gesamte Aminosäuresequenz jedoch recht niedrig ausfällt (Identität: 16-34 %, Ähnlichkeit 27-48 %), während die Identität der Endophiline 1, 2 und 3 untereinander bei 50-84 % und die Ähnlichkeit bei 61-95 % liegt, wenn man die einzelnen Bereiche der Proteine separat betrachtet (Abbildung 4-12). Daher wurde das neue Endophilin einer neuen Subfamilie zugeordnet und als Endophilin B1 bezeichnet. Zur besseren Unterscheidung erhielten die bekannten Endophiline die Bezeichnungen A1, A2 und A3 (siehe auch: Huttner und Schmidt, 2000).

5.1.3.2 Interaktion mit PACSIN 1

Da PACSIN 1 über seine SH3-Domäne an den Two-Hybrid-Klon 48-9 bindet, wurde die Sequenz genauer auf potentielle SH3-bindende prolinreiche Peptidsequenzen untersucht. Die zur Bindung an die PACSIN 1-SH3-Domäne notwendigen Proline lagen jedoch in einer Region des Two-Hybrid-Klons, die der 5'-nichttranslatierten Region von Endophilin B1 entspricht und somit in der natürlichen Aminosäuresequenz von Endophilin B1 nicht enthalten ist. Diese Aminosäuren werden artifiziell im Two-Hybrid-

System translatiert, so daß Endophilin B1 nicht als Bindungspartner von PACSIN 1 angesehen werden kann.

5.1.3.3 LPAAT-Aktivität von Endophilin B1

Nachdem durch Präzipitationsexperimente bestätigt wurde, daß Endophilin B1 spezifisch an aktivierte Fettsäuren wie Palmitoyl-Coenzym A bindet und somit ein wichtiges Kriterium für eine LPAAT-Aktivität aufwies, wurde in einer Kollaboration mit A. Schmidt und W. B. Huttner (Heidelberg) die enzymatische Aktivität von Endophilin B1 mit der von Endophilin A1 verglichen.

Sowohl Endophilin B1 voller Länge als auch eine Deletionsmutante ohne die SH3-Domäne wiesen als rekombinant exprimierte GST-Fusionsproteine eine mit Endophilin A1 vergleichbare LPAAT-Aktivität auf. Es muß daher die Frage gestellt werden, welche Funktion eine weitere Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase ausüben könnte, da mit den drei bekannten Endophilinen A1, A2 und A3 in fast allen untersuchten Geweben mindestens eine Endophilin-Isoform vorkommt (Giachino *et al.*, 1997; So *et al.*, 2000).

5.1.3.4 Expression und Spleißen von Endophilin B1

Im Verlauf der Charakterisierung von Endophilin B1 wurde die Expression sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene untersucht, nachdem Endophilin B1-spezifische Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen mit rekombinant exprimiertem GST-Endophilin B1-CT erhalten wurden. Die ubiquitäre Expression des Endophilin B1-Transkripts lieferte jedoch keine Hinweise auf eine gewebespezifische Funktion wie im Falle der hirnspezifischen Expression von Endophilin A1 und seiner Funktion in der Endozytose synaptischer Vesikel. Allerdings zeigten sich nach längerer Belichtung des Autoradiogramms weitere Transkripte von bis zu 8 kb Länge im Northern Blot, die sehr wahrscheinlich durch alternatives Spleißen oder Polyadenylieren entstehen.

Die genomische Organisation des humanen Endophilin B1 bestätigte dieses, da die 3'-nichtkodierende Region hauptsächlich aus einem großen Exon besteht und mehrere potentielle Polyadenylierungssignale enthält, die mit den verschiedenen beobachteten Transkriptlängen gut korrelieren. Zusätzlich zeigte sich, daß die Deletion von 63 Basenpaaren, die in einigen cDNA- und EST-Klonen von Endophilin B1 enthalten ist, exakt den Exons 6 und 7 entspricht. Mittels RT-PCR konnte nachgewiesen werden, daß diese Exons alternativ gespleißt werden, da mit den in Exon 5 und 10 platzierten Oligonukleotiden nur in Hirngewebe ein Exon 6 und 7 umfassendes Fragment amplifiziert werden konnte. Von Endophilin B1 existieren daher mindestens zwei verschiedene Transkripte, von denen eines hirnspezifisch Exon 6 und 7 beinhaltet.

Die Analyse der Gewebeverteilung des Endophilin B1-Proteins ergab, daß das gegen ein carboxyterminales Fragment generierte polyklonale Serum in einer Verdünnung von 1:40000 ausschließlich eine 42 kDa große Bande in Hirnextrakten erkennt. Setzte man das Serum in einer Verdünnung nicht größer als 1:20000 ein, so wurden weitere Banden detektiert, die verschiedene ubiquitäre bzw. gewebespezifische Endophilin B1-Isoformen repräsentieren könnten.

Da die Subfamilie der Endophiline A1, A2 und A3 vermutlich in allen Geweben mit mindestens einer Isoform vertreten ist, deutet die ubiquitäre Expression von Endophilin B1 mit einer zusätzlichen hirnspezifischen Spleißvariante darauf hin, daß die Endophiline der Subfamilie B zusammen mit den Endophilinen der Subfamilie A vorkommen und daher möglicherweise eine andere Aufgabe als Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase wahrnehmen oder aber die Endophiline A1-A3 bei der Endozytose clathrinumhüllter Vesikel ergänzen.

Wichtige Hinweise auf die Funktion von Endophilin B1 werden daher sowohl die intrazelluläre Verteilung als auch die Bindungspartner im Vergleich zu den bekannten Endophilinen liefern, insbesondere dann, wenn sich Unterschiede zu den bekannten Endophilinen ergeben.

5.1.3.5 Intrazelluläre Verteilung und Interaktionen von Endophilin B1

Die intrazelluläre Verteilung von Endophilin B1 in Vesikel-ähnlichen Strukturen und die Kolo-kalisation mit Dynamin und Clathrin läßt vermuten, daß Endophilin B1 an der Vesikelabschnürung von intrazellulären Kompartimenten beteiligt ist, die sowohl eine Dynamin-Isoform als auch Clathrin benötigt. Da der verwendete Antikörper (Transduction Laboratories) Isoform-übergreifend verschiedene Dynamine erkennt, interagiert Endophilin B1 sehr wahrscheinlich auch mit den nicht-neuronalen Isoformen von Dynamin 2 und 3. Hinweise hierauf liefert die Präzipitation („Pull down“) mit immobilisierten Endophilin-Isoformen, bei der Dynamin-Isoformen mit leicht unterschiedlichen Molekulargewichten detektiert werden. Neben dem 100 kDa großen Dynamin 1 bindet Endophilin B1 auch an kürzere Isoformen, die vermutlich verschiedenen Spleißvarianten von Dynamin 2 und 3 entsprechen. Auffallend an der Bestimmung der Bindungspartner von Endophilin B1 ist jedoch, daß Endophilin B1 nicht wie Endophilin A1 und A3 an die synaptischen Proteine Synaptojanin 1 und Amphiphysin 1 bindet, sondern mit den bisher bekannten Endophilinen nur Dynamin und Huntingtin als Bindungspartner teilt. Endophilin B1 wird daher vermutlich nicht an der clathrinvermittelten Endozytose synaptischer Vesikel beteiligt sein.

5.1.3.6 Endophilin B1 und clathrinvermittelte Endozytose

Ein häufig eingesetztes Modell zur clathrinvermittelten Endozytose ist die Aufnahme von Eisen-Transferrin-Komplexen durch Transferrin-Rezeptoren. Zellen sekretieren Transferrin, das freie Eisen-Ionen komplexiert, um den zellulären Eisenbedarf zu decken. Nach Bindung des Eisen-Transferrin-Komplexes an den Transferrin-Rezeptor wird dieser über clathrinumhüllte Vesikel von der Plasmamembran zu endosomalen Kompartimenten transportiert, um von dort aus nach Ablösung des Eisens mit seinem Liganden wieder zur Plasmamembran zurücktransportiert zu werden (Dautry-Varsat, 1986). Viele Proteine, die an der clathrinvermittelten Endozytose synaptischer Vesikel beteiligt sind, beeinflussen bei Überexpression oder Mikroinjektion in nichtneuronale Zellen das Recycling des Transferrin-Rezeptors. Insbesondere die SH3-Domänen von Endophilin A1, PACSIN 1/Syndapin, Amphiphysin II und Intersectin verhindern die Endozytose des Transferrin-Rezeptors *in vitro* (Simpson *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob Endophilin B1 wie PACSIN 1 und PACSIN 3 (Modregger *et al.*, 2000) die ligandeninduzierte Aufnahme des Transferrin-Rezeptors inhibiert.

Mittels Durchflußzytometrie wurde die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Transferrin in Abhängigkeit von der Überexpression der DsRed-Fusionsproteine von Endophilin B1, PACSIN 1 und PACSIN 3 detektiert. Die Einteilung in drei Gruppen von schwach, mittel und stark überexprimierenden Zellen ergab, daß nur in stark PACSIN 1 oder PACSIN 3 überexprimierenden Zellen eine deutliche Inhibition der Endozytose nachzuweisen war. Lassen sich diese Ergebnisse unter Berücksichtigung der Bindungspartner und der intrazellulären Verteilung von Endophilin B1 verallgemeinern, so scheint Endophilin B1 weder an der allgemeinen clathrinvermittelten Endozytose noch an der speziellen clathrinvermittelten Endozytose synaptischer Vesikel beteiligt zu sein.

5.1.3.7 Zusammenfassung Endophilin B1

Die Isolierung einer neuen Endophilin-Isoform mit unterschiedlichen Interaktionspartnern und einer intrazellulären Vesikel-ähnlichen Verteilung eröffnet neue Perspektiven für das Verständnis intrazellulärer Vesikelbildung. Bisher wurde angenommen, daß die Endophiline hauptsächlich an endozytotischen Prozessen beteiligt sind. Da jedoch schon früher gezeigt wurde, daß aktivierte Fettsäuren zur Vesikelabschnürung zum Beispiel von Golgi-Membranen benötigt werden (Glick und Rothman, 1987; Pfanner *et al.*, 1989), ist anzunehmen, daß hinter der LPAAT-Aktivität bei Vesikelabschnürungsprozessen ein generelles Prinzip steht. Für Golgi-Membranen wurde beispielsweise gezeigt, daß das nicht mit den Endophilinen verwandte CtBP/BARS ebenfalls LPAAT-Aktivität hat, jedoch nicht an der clathrinvermittelten Vesikelbildung beteiligt ist (Weigert *et al.*, 1999). Endophilin B1 als Acyl-Transferase nimmt daher vermutlich eine Funktion bei der clathrinvermittelten Vesikelbildung aus Donormembranen intrazellulärer Kompartimente wie Golgi, Endoplasmatischem Retikulum oder Endosomen wahr.

5.1.4 Huntingtin

Die verschiedenen proteinchemischen Experimente zur Identifikation bisher unbekannter Bindungspartner von PACSIN 1 ergaben, daß PACSIN 1 über seine SH3-Domäne an Huntingtin bindet. Diese Ergebnisse konnten mit Two-Hybrid-Analysen von PACSIN 1-Deletionsmutanten und Huntingtin-Exon 1-Protein bestätigt werden. Gleichzeitig grenzten sie das Bindungsmotiv auf die Proteinregion ein, die dem ersten Exon von Huntingtin entspricht. Das erste Exon des Huntingtin-Gens kodiert neben der *Chorea Huntington* auslösenden Polyglutamin-Region eine prolinreiche Region, die der Bindung an SH3-Domänen verschiedener Proteine dient (Liu *et al.*, 1997; Sittler *et al.*, 1998).

Besonders interessant ist, daß die Bindung von Huntingtin an PACSIN-Proteine auf PACSIN 1 begrenzt ist. Weder PACSIN 2 noch PACSIN 3 interagierten mit Huntingtin im Two-Hybrid-System, mit dem auch schwächere Interaktionen detektiert werden können. Die SH3-Domänen der PACSIN-Proteine sind hoch konserviert (Abbildung 4-2B), von den ca. 60 Aminosäuren der PACSIN 1- und PACSIN 2-SH3-Domänen sind nur vier Aminosäuren ausgetauscht, zwei davon sind konservative Austausche. Daher wäre eher zu erwarten gewesen, daß die SH3-Interaktionen der PACSIN-Proteine für alle Isoformen gemeinsam bestehen.

Da neben der Interaktion von PACSIN 1 mit Huntingtin gezeigt werden konnte, daß Huntingtin auch an Endophilin B1 und Endophilin A1 SH3-spezifisch bindet, ist die prolinreiche Region in Huntingtin ein gemeinsames Bindungsmodul für mehrere endozytotische SH3-Proteine. Die Interaktionen dieser Region lieferten somit weitere Hinweise auf eine allgemeine Huntingtin-Funktion in der Vesikelformation oder deren Transport, die aufgrund der Vesikel-ähnlichen intrazellulären Verteilung von Huntingtin bisher nur vermutet wurde. Das ubiquitär exprimierte Huntingtin spielt daher nicht nur in der clathrinvermittelten Endozytose unter Beteiligung von Endophilin A3 (Sittler *et al.*, 1998) und HIP1R (Huntingtin interacting protein related; Engqvist-Goldstein *et al.*, 1999) eine Rolle, sondern scheint generell an Vesikelabschnürungsprozessen beteiligt zu sein.

Die Bindungspartner von Huntingtin, PACSIN 1 und Endophilin, interagieren jedoch auch mit einigen Proteinen, die eher den zu transportierenden Proteinen zuzurechnen sind und vermutlich nicht aktiv an der Vesikelbildung beteiligt sind. So interagiert die Metalloprotease Disintegrin MDC 15 mit PACSIN 3 und Endophilin A1, das zusätzlich auch Disintegrin MDC 9 bindet (Howard *et al.*, 1999). In *Xenopus* reguliert PACSIN 2 die Lokalisierung und vermutlich auch die Aktivität von Disintegrin MDC 13 über SH3-spezifische Interaktionen (Cousin *et al.*, 2000). Interessanterweise bindet Endophilin A1 bevorzugt an die Pro-Form der Disintegrine, die proteolytisch in medialen Golgi-Kompartimenten zu reifen Disintegrinen prozessiert wird. Es ist daher anzunehmen, daß Endophilin A1 oder möglicherweise auch die weiteren Mitglieder der Endophilin A-Subfamilie am Transport oder an der Reifung dieser Proteasen beteiligt sind. Zusätzlich inter-

agieren die Endophiline A1-A3 mit dem β 1-adrenergen Rezeptor und können die Endozytose des Rezeptors und die G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion dieses Rezeptors beeinflussen (Tang *et al.*, 1999). Es ist daher ebenso möglich, daß PACSIN 1 und die Endophiline für den Transport und die Membranassoziation Huntingtins verantwortlich sind, während Huntingtin als Fracht nicht aktiv am Vesikelbildungsprozess teilnimmt. Allerdings kommt Huntingtin nur in Ratten- und Humanhirn membranassoziiert vor, während es in Maushirn eher eine zytosolische Lokalisierung aufweist (Wood *et al.*, 1996). Somit besteht die Möglichkeit, daß Huntingtin mit seinen Bindungspartnern teilweise verschiedene Funktionen in den verschiedenen Spezies wahrnehmen kann.

Insbesondere die mögliche Beteiligung von PACSIN 1 und Endophilin B1 an der weitgehend unklaren Pathogenese der Erkrankung *Chorea Huntington* hat diese Interaktionen zum Gegenstand genauerer Analysen gemacht.

5.2 PACSIN 1 und Endophilin B1 in *Chorea Huntington*

5.2.1 *Chorea Huntington*

Die progressive neurodegenerative Erkrankung *Chorea Huntington* zeigt typischerweise erste Auswirkungen im Alter von 40 Jahren, der Ausbruch der Erkrankung steht jedoch in direktem Zusammenhang mit der Länge der aminoterminalen Polyglutamin-Wiederholungen in Huntingtin. Durchschnittlich beträgt die Länge der Polyglutamin-Wiederholungen 16-18 in gesunden Personen, während Individuen mit 35-39 Glutaminen *Chorea Huntington* entwickeln können, jedoch nicht zwangsläufig erkranken müssen. Bei Patienten mit 40-60 Glutaminen wird die Krankheit im Erwachsenenalter mit einem Durchdringungsgrad von 100 % ausbrechen, seltene Fälle mit mehr als 60 Glutaminen werden von der juvenilen Form der Erkrankung betroffen, die im Alter von unter 20 Jahren ausbricht. In der Regel führt *Chorea Huntington* unausweichlich nach 15-20 Jahren zum Tod der Patienten (Zur Übersicht: Reddy *et al.*, 1999; Tobin und Signer, 2000).

Form und Verlauf von *Chorea Huntington* in homozygoten und heterozygoten Trägern des verlängerten Huntingtin-Gens unterscheiden sich nicht, die Erkrankung kann daher durch einen dominant-negativen Effekt des mutierten Huntingtins hervorgerufen werden („loss-of-function“-Modell) oder aber durch eine neu erworbene Funktion des mutierten Huntingtins ausgelöst werden („gain-of-function“-Modell). Da jedoch der komplette Verlust von Huntingtin in Maus-Nullmutanten embryonal letal ist (Zeitlin *et al.*, 1995), kommt eine neu hinzugekommene Funktion eher als Auslöser der Krankheit in Betracht, beispielsweise durch die Interaktion des mutierten Huntingtins mit einem weiteren Protein.

Chorea Huntington geht mit verschiedenen molekularen Veränderungen in den betroffenen Neuronen einher. Auffallend sind die nicht-kovalenten Huntingtin-Aggregate im Zytosol und in den Zellkernen, die ebenfalls in transgenen Mäusen, transfizierten Zellen unter Zellkulturbedingungen und sogar in *in vitro*-Experimenten detektiert werden können. Kovalent verknüpfte Huntingtin-Aggregate entstanden *in vitro* durch Transglutaminasen (Karpuj *et al.*, 1999), die die Ausbildung von Glutamin-Lysin-Isopeptidbindungen katalysieren. Das Auftreten dieser kovalenten Aggregate *in vivo* konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

Mehrere monoklonale Antikörper, die stärker an das mutierte Huntingtin als an das Wildtyp-Protein binden, weisen darauf hin, daß die Verlängerung der Glutaminregion eine Konformationsänderung im Protein auslöst (Wilkinson *et al.*, 1997; Persichetti *et al.*, 1999). Diese Konformationsänderung, die theoretisch berechnet wurde (Lathrop *et al.*, 1998), verursacht dann die Aggregation des verlängerten Huntingtins. Eine direkte Verbindung der Aggregate mit der Pathogenese ist jedoch noch unklar. Da die Aggregate *in vivo* nur mit mehr als 35 Glutaminen auftreten, wenn der Schwellenwert für die Pathogenese überschritten ist, ist lange angenommen worden, daß die Aggregate zelluläre Funktionen beeinträchtigen und somit die Erkrankung auslösen. Andererseits können Aggregation und Pathogenese zwei unabhängige, parallel ablaufende Vorgänge sein.

Unter Umständen dienen die Huntingtin-Aggregate auch dem Schutz der Zellen vor mutiertem Huntingtin, denn die Aggregate enthalten auch Komponenten des Proteasoms wie Chaperone und Ubiquitin (Kalchman *et al.*, 1996; Jana *et al.*, 2000). In Übereinstimmung mit dieser Annahme führt die Überexpression von verlängertem Huntingtin in Zellen mit gestörtem Ubiquitin-Abbauweg zu einer Verringerung der Aggregate und beschleunigt den Zelltod (Saudou *et al.*, 1998). Desweiteren zeigen die Untersuchungen eines transgenen Mausmodells, in dem mutiertes Huntingtin Tetracyclin-reguliert exprimiert werden kann, daß sich die Huntingtin-Aggregate nach Abschalten der Huntingtin-Überexpression auflösen und die neurologischen Ausfälle teilweise reversibel sind (Yamamoto *et al.*, 2000).

Im Endstadium der Erkrankung kommt es zu einem selektiven Verlust von Neuronen im Striatum (Caudatum, Putamen), frontalen Kortex, und in geringeren Ausmaßen in Hippocampus und Subthalamus. Häufig wurde die Apoptose der Neuronen mit den Huntingtin-Aggregaten in den Zellkernen der Neuronen in Verbindung gebracht, jedoch lösen Polyglutamin-Aggregate *per se* Caspase-induzierte Apoptose aus (Moulder *et al.*, 1999). Apoptose-Inhibitoren dagegen verlangsamten die neurodegenerativen Prozesse und zögern den Zelltod in *Chorea Huntington* heraus (Chen *et al.*, 2000). Da in *Chorea Huntington* jedoch auch Rezeptoren und Neurotransmitter betroffen sind, könnte die Apoptose auch durch Übererregung der Neurone ausgelöst werden (Chen *et al.*, 1999b). So ist die Expression der metabotropen Glutamat-Rezeptoren 1, 2 und 3 sowie der D1- und D2-dopaminergen Rezeptoren in *Chorea Huntington* teilweise vermindert (Weeks *et al.*,

1996; Cha *et al.*, 1998). Zusätzlich scheint der Neurotransmitter Enkephalin im Striatum transgener HD-Mäuse drastisch reduziert zu sein (Menalled *et al.*, 2000). Ebenso sind viele Proteine aus verschiedenen Signaltransduktionswegen deutlich differentiell reguliert, wie DNA-Array-Vergleiche von Wildtyp-Striatum zu HD-Striatum aus transgenen Mäusen ergaben (Luthi-Carter *et al.*, 2000).

Eine großes Rätsel in der Pathogenese von *Chorea Huntington* ist, warum trotz der ubiquitären Expression von Huntingtin und Aggregaten in sehr verschiedenen Zelltypen nur sehr wenige Neurone im Striatum und frontalen Kortex besonders stark von der Erkrankung betroffen sind. Verschiedene Hypothesen, die von einer spezifischen Expression von Rezeptoren in diesen Neuronen und damit verbundenem Streß durch Übererregung ausgehen, konnten jedoch die Selektivität der Erkrankung noch nicht erklären. Daher wurde oft vermutet, daß diese Selektion von einem unbekannten Protein verursacht wird, das mit Huntingtin interagiert.

5.2.2 Huntingtin-PACSIN 1-Interaktionen

Das neurospezifische Mitglied der PACSIN-Familie, PACSIN 1, interagiert über seine SH3-Domäne mit der prolinreichen Region von Huntingtin. Ausgehend von Gewebeproben aus dem Striatum von *Chorea Huntington*-Patienten und Kontrollgewebeproben wurde daher untersucht, ob PACSIN 1 an der Pathogenese von HD beteiligt sein könnte. Insbesondere wurden die Auswirkungen von pathologisch verlängertem Huntingtin auf die Interaktion mit PACSIN 1 mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems analysiert.

Es konnte nachgewiesen werden, daß die Interaktion von PACSIN 1 mit pathologisch verlängertem Huntingtin mit 44 Glutaminen die Expression des Reportergens β -Galaktosidase ca. um den Faktor 2 im Vergleich zu Wildtyp-Huntingtin mit 18 Glutaminen erhöht. Da PACSIN 1 über seine SH3-Domäne mit verschiedenen Proteinen wie Dynamin, Synaptojanin, N-WASP und dem Two-Hybrid-Klon 18-1 interagiert, ist anzunehmen, daß diese Interaktionen durch die deutlich verstärkte Interaktion mit mutiertem Huntingtin betroffen sein werden. Die meisten der bekannten Interaktionspartner von PACSIN 1 sind wie auch PACSIN 1 selbst an der Endozytose synaptischer Vesikel beteiligt, die durch Huntingtin beeinflusst werden könnte. Aus diesem Grund könnte eine veränderte Interaktion mit PACSIN 1 in *Chorea Huntington* direkt zum neurologischen Phänotyp der Erkrankung beitragen. Die Aktivität an Synapsen wird vermutlich deutlich beeinflusst, weil der Umsatz an synaptischen Vesikeln reduziert wird. Ebenso könnte das Recycling von Rezeptoren an den postsynaptischen Membranen deutlich gestört werden. Werden aktivierte Rezeptoren nicht mehr schnell genug durch Endozytose aus der postsynaptischen Membran entfernt, kann dieses in den betroffenen Neuronen zu toxischem Streß durch Übererregung führen, da diese Zellen nicht in der Lage sein werden, sich schnell an Reize zu adaptieren und die Rezeptorzahl durch Endozytose zu regulieren. Den betroffenen Neuronen bliebe nur die Verringerung der Expression zur Regulierung der

Rezeptoranzahl, was in transgenen Huntingtin-Mäusen beobachtet werden konnte (Weeks *et al.*, 1996; Cha *et al.*, 1998).

Die stärkere Interaktion von PACSIN 1 mit pathologisch verlängertem Huntingtin löst vermutlich die Delokalisation von PACSIN 1 aus, die in Gewebeschnitten aus frontalem Kortex schon in frühen Phasen von *Chorea Huntington* nachzuweisen ist (Abbildung 4-30). PACSIN 1-spezifische Antikörper detektieren PACSIN 1 nur noch linear entlang der Neuriten, jedoch nicht mehr in den synaptischen Verdickungen („boutons“), wo PACSIN 1 an der Endozytose synaptischer Vesikel und vermutlich auch am Recycling von Rezeptoren beteiligt ist. Ob der Verlust von PACSIN 1 in den synaptischen Verdickungen direkt zu den charakteristischen neurologischen Phänotypen in HD führt, müssen weitere Studien zeigen.

Betrachtet man jedoch die betroffenen Hirnregionen, so zeichnet sich eine gute Korrelation zwischen dem Verlust von Neuronen in *Chorea Huntington* und der Expression von PACSIN 1 ab. PACSIN 1 wird neben dem Kortex auch im Striatum exprimiert (Ritter, 2001), wo es in *Chorea Huntington* zu einer extremen Reduktion der Signalweiterleitung kommt, so daß in Folge dessen die Hemmung der Neuronen des externen Pallidum reduziert wird. Dieses reduziert wiederum die Inhibition von Neuronen des Thalamus und steigert die des Subthalamus, der damit praktisch inaktiviert wird. Dies führt zu einer gesteigerten Aktivität der Neuronen des Motorkortex und des internen Segments des Pallidum, so daß die komplexe motorische Steuerung außer Kontrolle gerät und die choreiformen Bewegungsstörungen in frühen Phasen von *Chorea Huntington* ausgelöst werden (Abbildung 5-1).

In späteren Phasen geht die Hyperaktivität, zu der die unkontrollierten choreiformen Bewegungen zählen, in hypoaktive bis hin zu akinetischen Zuständen über. Diese Phasen werden vermutlich durch den vollständigen Verlust bestimmter Neurone im Striatum und Kortex ausgelöst. In diesen Hirnregionen wird von den drei PACSIN-Proteinen hauptsächlich PACSIN 1 exprimiert, während PACSIN 2 und 3 abweichende Expressionsmuster zeigen (Ritter, 2001). PACSIN 1 ist daher vermutlich eines der Sensor-Proteine, die für den eng begrenzten Verlust neuronaler Aktivität verantwortlich sind.

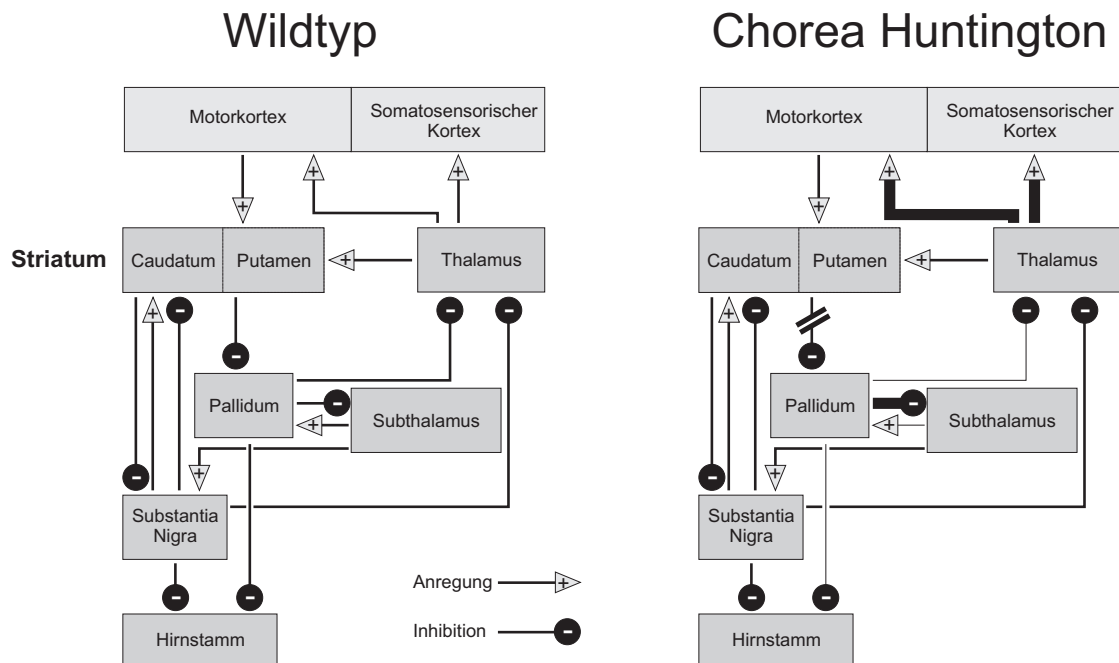


Abbildung 5-1. Schematisches Diagramm der Hauptverbindungen der Basalganglien und des Thalamus, die an der motorischen Kontrolle beteiligt sind (nach Delcomyn, 1997). Durch den Ausfall der Inhibition des Pallidum durch das Putamen des Striatum kommt es in *Chorea Huntington* zu diversen Fehlfunktionen in der motorischen Kontrolle (dünnere Linien entsprechen geringerer Anregung/Inhibition; breitere Linien einer größeren Anregung/Inhibition).

Letztendlich für den Tod der Patienten verantwortlich gemacht wird jedoch der Verlust von Neuronen im Striatum und Kortex. Wird die Apoptose im Striatum und Kortex durch Übererregung der Neurone mitverursacht, könnte die durch PACSIN 1-Huntingtin-Interaktionen gestörte Endozytose synaptischer Vesikel ebenfalls an diesen späten Auswirkungen von *Chorea Huntington* beteiligt sein. Dieser toxische Streß durch Übererregung könnte die Caspase-aktivierte Apoptose drastisch verstärken oder überlagern. Diese Möglichkeit eines zusätzlichen, die Apoptose verstärkenden oder auslösenden Faktors besteht, da Apoptose und Aggregation von Huntingtin nicht unbedingt miteinander gekoppelt sind (Kim *et al.*, 1999).

PACSIN 1 und seine verstärkte Interaktion mit pathologisch verlängertem Huntingtin scheint daher direkt an der Pathogenese von *Chorea Huntington* beteiligt zu sein. Möglicherweise spielt auch die Interaktion von PACSIN 1 und 18-1 eine indirekte Rolle in HD, da 18-1 zwischen einer zytosolischen und einer nukleären Lokalisation wechselt und am nukleozytosolischen Transport des pathologisch verlängerten Huntingtins beteiligt sein könnte.

5.2.3 Huntingtin-Endophilin B1-Interaktionen

Neben der bekannten Interaktion von Endophilin A3 mit Huntingtin interagierten sowohl das neue Endophilin B1 als auch das hauptsächlich im Gehirn exprimierte Endophilin A1 mit Huntingtin. Es wurde daher untersucht, ob das neue Endophilin B1 entsprechend des Endophilin A3 stärker an pathologisch verlängertes Huntingtin bindet.

Endophilin B1 interagiert jedoch im Gegensatz zu PACSIN 1 und Endophilin A3 schwächer mit pathologisch verlängerten Huntingtin-Formen als mit Wildtyp-Huntingtin. Zu beachten ist jedoch, daß sowohl PACSIN 1 als auch die Endophiline der Subfamilie A an der clathrinvermittelten Endozytose beteiligt sind, während Endophilin B1 an intrazellulären Vesikel-ähnlichen Strukturen lokalisiert ist und keinen Einfluß auf die Endozytose des Transferrin-Rezeptors hat. Daher ist Endophilin B1 eher in der clathrinvermittelten Vesikelbildung aus intrazellulären Donormembranen aktiv, was in *Chorea Huntington* zu Störungen des intrazellulären Vesikeltransports führen könnte.

Die schwächere Bindung an mutiertes Huntingtin deutet jedoch darauf hin, daß die Endophilin B1-Huntingtin-Bindung entweder mit einem Funktionsverlust in betroffenen Zellen einhergeht („loss-of-function“-Modell) oder aber mit großer Wahrscheinlichkeit überhaupt keinen Einfluß auf die Erkrankung hat. Da die meisten HD-Patienten heterozygot sind und somit zusätzlich über Wildtyp-Huntingtin verfügen, heterozygote Huntingtin-Null-Mutanten jedoch keinen Phänotyp aufweisen, sollte der teilweise Verlust der Endophilin B1-Huntingtin-Interaktionen keinen bedeutenden Einfluß auf die Pathogenese von *Chorea Huntington* haben.

5.3 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Die genauen Abläufe bei der Ablösung von Vesikeln aus Donormembranen mit Clathrin als Hüllprotein erfordern einen sehr komplexen Proteinapparat. Zur weiteren Aufklärung dieser Vorgänge wurden unbekannte Bindungspartner der PACSIN 1-SH3-Domäne identifiziert und näher charakterisiert.

Die Analyse der PACSIN 1-Interaktionen mit den Proteinen 18-1 und Huntingtin zeigte, daß PACSIN 1 neben der Endozytose synaptischer Vesikel auch an der intrazellulären Vesikelbildung oder am Vesikeltransport teilnehmen könnte. Auch wenn die Interaktion von Endophilin B1 mit PACSIN 1 letztendlich nicht bestätigt werden konnte, ist Endophilin B1 als Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase an Vesikelabschnürungsprozessen beteiligt und interagiert ebenfalls mit Huntingtin, einem gemeinsamen Bindungspartner von PACSIN 1 und den Proteinen der Endophilin-Familie. Endophilin B1 stellt ein wichtiges Mitglied der Endophilin-Familie dar, weil es sich in seiner intrazellulären Lokalisation und seinen Bindungspartnern deutlich von den bekannten Endophilinen A1, 2 und 3 unterscheidet und daher neue Erkenntnisse über die Vesikelabschnürung von intrazellulären Kompartimenten liefern wird.

Der PACSIN 1-Bindungspartner 18-1 wechselt vermutlich zwischen zytosolischer und nukleärer Lokalisierung und verknüpft PACSIN 1 entweder mit nukleozytosolischen Transportwegen oder aber ist an der Regulation der PACSIN 1-Funktion beteiligt. Als sehr prolinreiches Protein dient 18-1 vermutlich als Adapter zwischen SH3-bindenden Proteinen. Im Zusammenhang mit Huntingtin als weiterem Bindungspartner von PACSIN 1 könnte 18-1 am Import von mutiertem Huntingtin in den Zellkern in *Chorea Huntington* mitwirken. Die genaue Funktion der beiden Proteine 18-1 und Huntingtin bleibt jedoch unklar, aufgrund der Vesikel-ähnlichen Verteilung im Zytosol scheinen sie ebenso wie PACSIN 1 an der Vesikelabschnürung oder dem Transport von Vesikeln beteiligt zu sein. Durch die Entwicklung von geeigneten zellfreien Modellsystemen sollte die Analyse dieser Proteine in den komplexen vesikelbildenden Vorgängen in Zukunft möglich werden. Zelluläre Modelle und Null-Mutanten werden solche Studien vervollständigen.

Die progressive neurodegenerative Erkrankung *Chorea Huntington* ist wahrscheinlich in Teilen ihres Erscheinungsbildes von einer Störung der Endozytose synaptischer Vesikel geprägt. In der frühen Phase der Erkrankung mit Hyperaktivität der betroffenen Individuen ist noch kein Verlust von Neuronen durch Apoptose nachzuweisen, PACSIN 1 ist jedoch nicht mehr in den synaptischen Verdickungen vorhanden. Damit könnte das Recycling von synaptischen Vesikeln und die synaptische Aktivität dieser Neurone stark betroffen sein und die Hyperaktivität der HD-Patienten auslösen. Ob PACSIN 1 auch die Apoptose in den betroffenen Neuronen des Striatums und Kortex durch gestörte Endozytose synaptischer Vesikel und in Folge davon durch Übererregung der Neurone toxischen

Streß auslöst, oder ob diese wie bisher angenommen durch andere Effekte wie die Polyglutamin-verursachte Caspase-Aktivierung ausgelöst wird, werden zukünftige Experimente zeigen. Die Ergebnisse der Analyse von PACSIN 1 und seinen Bindungspartnern in dieser Arbeit deuten insgesamt daraufhin, daß PACSIN 1 mit seinen Bindungspartnern eine zentrale Rolle in der Pathogenese von *Chorea Huntington* einnimmt.

Im Hinblick auf *Chorea Huntington* wird vor allem die Generierung PACSIN 1-defizienter Mäuse interessant. Da auch in diesen Mäusen kein PACSIN 1 in den von *Chorea Huntington* betroffenen Hirnregionen vorhanden sein wird, werden solche Null-Mutanten vermutlich ähnliche Phänotypen wie transgene Huntingtin-Mäuse aufweisen, wenn das Fehlen von PACSIN 1 in den Synapsen für die Pathogenese von HD entscheidend ist. Wenn allerdings PACSIN 1 so wichtig für die Endozytose ist, daß die embryonale Entwicklung PACSIN 1-defizienter Mäuse gestört wird, könnte die Analyse PACSIN 1-defizienter neuronal-differenzierter embryonaler Stammzellen interessante Erkenntnisse liefern.

Insgesamt betrachtet bieten die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse eine Grundlage zum weiteren Verständnis der Endozytose synaptischer Vesikel und einer bis heute nicht geklärten Pathogenese von *Chorea Huntington*-Patienten.

6 Material und Methoden

6.1 Verwendete Materialien

Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Roche bezogen. Alle Materialien wurden nach Herstellerangaben eingesetzt, sofern nicht anders angegeben.

Oligonukleotide (siehe Anhang, Kapitel 7.5) wurden von MWG Biotech in HPSF (high purity salt free) Qualität bezogen. Die Konzentration wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm kontrolliert (1 OD₂₆₀ entspricht einer Konzentration von 37 µg/ml).

Medien, Lösungen und Puffer wurden in deionisiertem Wasser angesetzt und falls benötigt 20 min bei 121 °C in einem Autoklaven dampfsterilisiert.

6.2 Methoden

Molekularbiologische und proteinchemische Methoden wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Harlow und Lane, 1988, Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1997). Abweichungen und eigene Methoden werden im folgenden aufgeführt.

6.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Restriktion von DNA durch Endonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs und Roche Diagnostics bezogen und in den mitgelieferten Puffern eingesetzt. In einem Standard-Restriktionsansatz wurden 0,1-2 µg DNA mit 2-10 Units Restriktionsenzym in 20 µl Gesamtvolumen bei der empfohlenen Temperatur für 1-8 Stunden inkubiert und mittels TAE-Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen und Restriktionsansätze wurden elektrophoretisch in 0,5-3 % (w/v) Agarosegelen in TAE-Puffer bei 4-8 Volt/cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Die durch Ethdiumbromid-Zusatz (0,5 µg/ml) angefärbte DNA wurde unter UV-Licht dokumentiert und gewünschte Fragmente ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen

DNA-Banden wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers aus der Agarose isoliert.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA-Isolierung im Mini-Maßstab (10-20 µg) erfolgte durch alkalische Lyse der Bakterien und alkoholischer Präzipitation der DNA aus 1,5 ml Kulturvolumen (Birnboim, 1983). Größere Mengen Plasmid-DNA (100 µg) wurden mit Hilfe des NucleoBond PC100-Kits nach Protokollen des Herstellers isoliert (Macherey-Nagel). Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde durch Messung der optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm und Berechnung des Quotienten aus OD_{260}/OD_{280} ermittelt (1 OD_{260} entspricht 50 µg/ml dsDNA, für reine DNA gilt $OD_{260}/OD_{280} \geq 1,8$).

DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch das Service-Labor des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) unter Verwendung des ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits. Die Sequenzierungs-PCR wurde mit 10 pmol spezifischen Oligonukleotiden und 150-300 ng DNA als Matrize durchgeführt und mit einem ABI Prism 377 Automated Sequencer analysiert.

Herstellung radioaktiv markierter Sonden

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des TaKaRa Labelling Kits radioaktiv markiert. Das verwendete Kit enthält degenerierte Oligonukleotide, die sich an die denaturierte DNA anlagern und durch *BcaBEST* DNA Polymerase mit radioaktivem α -[32 P]-dCTP und nichtradioaktiven Nukleotiden verlängert werden. Nicht umgesetzte Nukleotide werden durch Gelfiltration (Nick-Säulen, Amersham Pharmacia Biotech) entfernt.

Durchmusterung von cDNA-Banken

Eine embryonale Maus-cDNA-Bank (Bank 559, Ressourcen-Zentrum Primär-Datenbank, RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) aus vereinzelt und auf Nylon-Membranen aufgetragenen cDNA-Klonen wurde mit radioaktiv markierten Sonden durchmustert. Die cDNA-Bank wurde durch reverse Transkription von RNA aus ganzen Embryonen des Stammes C57Bl6 x DBA mit oligo(dT)-Oligonukleotiden erhalten und in das Plasmid pSVSport1 kloniert.

Zur Isolation der gewünschten Klone wurden die in Formamid-Mix gelösten Sonden mit den Filtern zur Hybridisierung 12 h bei 42 °C inkubiert und anschließend 20 min bei

65 °C in 0,1x SSC und 0,1 % SDS gewaschen. Positive Klone, die durch Autoradiographie nachgewiesen wurden, wurden vom RZPD in *E. coli* transformiert zur Verfügung gestellt.

Isolierung von Poly(A)⁺-RNA

Die Isolierung von Poly(A)⁺-RNA aus Gewebeproben erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde das Gewebe in GIT-Puffer (4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, 0,5 % N-Laurylsarcosin, 0,1 M 2-Mercaptoethanol) homogenisiert, lysiert, die Gesamt-RNA mit Phenol bzw. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gewaschen und mit Isopropanol gefällt. Anschließend wurde aus der Gesamt-RNA mit Hilfe des Oligotex mRNA Kits (Qiagen) Poly(A)⁺-RNA gewonnen. Eine Mengenabschätzung erfolgte durch TAE-Agarose-Gelelektrophorese und Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm. Für reine RNA entspricht 1 OD₂₆₀ 40 µg/ml, der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte größer als 1,8 sein.

Northern Blot

Zur Charakterisierung der gewebespezifischen Expression wurden aus den zu analysierenden Geweben Poly(A)⁺-RNA-Proben isoliert, auf einem 1 %-Formaldehyd-Agarosegel größenfraktioniert und zur Kontrolle mit Ethidiumbromid gefärbt. Nach Kapillartransfer auf eine Hybond-XL-Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech) wurden die spezifischen Transkripte durch Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde markiert und durch Autoradiographie nachgewiesen. Mit Hilfe einer für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) spezifischen Sonde wurde die Unversehrtheit der Poly(A)⁺-RNA überprüft.

RACE

Zur Amplifikation unbekannter cDNA-Enden ausgehend von mRNA wurde die RACE-Technik („rapid amplification of cDNA ends“) eingesetzt. Zur Synthese des ersten cDNA-Strangs wurde das Smart RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) mit Superscript II Reverser Transkriptase (BRL) nach Herstellerangaben verwendet. Die durch Amplifikation mit dem Advantage 2 PCR Kit (Clontech) erhaltenen cDNA-Fragmente wurden in das Plasmid pCRII (Invitrogen) kloniert und sequenziert.

Reverse Transkription

Die Reverse-Transkriptase-Reaktion dient dazu, mRNA in cDNA revers zu transkribieren. Hierzu wurde Poly(A)⁺-RNA mit oligo(dT)-Oligonukleotiden mit der Reversen

Transkriptase SuperscriptII (BRL) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. 500 ng poly(A)⁺-RNA (3 µl) wurden mit 10 pmol 3'-CDS-Oligonukleotid (1 µl; Clontech) und 1 µl RNase-freiem Wasser 2 min auf 70 °C erwärmt und dann 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 2 µl 5x first-strand-buffer (Clontech), 1 µl 20 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl SuperscriptII versetzt und 1,5 h bei 42 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 µl Tricine-EDTA-Puffer (Clontech) und 7 min Inkubation bei 72 °C gestoppt.

PCR mit cDNA oder Plasmid-DNA als Matrize

Standard-Polymerase-Kettenreaktionen zur Amplifikation von Fragmenten bis 1500 bp und cDNA oder Plasmid-DNA als Matrize wurden wie in Abbildung 6-1 beschrieben in einem Biometra TRIO Thermoblock Thermocycler durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels TAE-Agarose-Gelelektrophorese analysiert, aus dem Gel isoliert und in Plasmide subkloniert.

Reaktionsansatz	
50 ng Matrizen-DNA	
20 pmol Oligo (sense)	
20 pmol Oligo (antisense)	
1 µl 25 mM dNTPs	
5 µl 10x PCR-Puffer mit 25 mM MgCl ₂ (Perkin-Elmer)	
1 µl Taq Polymerase (5 U, AmpliTaq, Perkin-Elmer)	
ad 50 µl H ₂ O	
PCR-Programm	
3 min 95 °C	
30-60 s 95 °C	30 x
30-60 s 60 °C	
60-120 s 72 °C	
5 min 72 °C	
∞ 4 °C	

Abbildung 6-1. Reaktionsansatz und PCR-Programm für Standard-PCR-Reaktionen. Die Anlagerungstemperatur (hier: 60 °C) ist matrizenspezifisch und wurde aus der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide zuzüglich 3 °C abgeleitet und anschließend optimiert. Die Elongationszeit betrug 60 s je 1 kb zu amplifizierender Sequenz.

Isolierung von genomischer DNA

Gewebeproben wurden über Nacht in 0,5 ml Lysis-Puffer mit 0,2 mg/ml RNase A und 1 mg/ml Proteinase K inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Extraktion mit Phenol/Chloroform und Chloroform von Proteinen gereinigt und mit 2,5-fachem Volumen kaltem 96% Ethanol gefällt und abzentrifugiert (21000x g, 15 min). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet aus genomischer DNA mit Ethanol (80%) gewaschen und erneut wie zuvor zentrifugiert. Die genomische DNA wurde in 100 µl Wasser gelöst.

PCR mit genomischer DNA als Matrize

Für die PCR mit Huntingtin-spezifischen Oligonukleotiden auf humaner genomischer DNA wurde das GC-Rich PCR System (Roche Diagnostics) verwendet, da insbesondere die CAG-Wiederholungsregion einen sehr hohen GC-Anteil besitzt und hohe Anlagertemperaturen erforderlich macht, um ein spezifisches PCR-Produkt zu erhalten. Entsprechend der Herstellerangaben wurden 35 µl Mix 1 und 15 µl Mix 2 (Abbildung 6-2) kurz vor der PCR-Reaktion gemischt, dem unten aufgeführten PCR-Programm (Abbildung 6-2) in einem Biometra TRIO Thermoblock Thermocycler unterzogen und analysiert. Die Elektrophorese wurde in einem 4 % Polyacrylamid-Gel in TBE-Puffer durchgeführt (Ausubel *et al.*, 1997), in Ethidiumbromid gefärbt und mittels Tank-Blot-Apparatur in TBE-Puffer auf Hybond XL-Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech) transferiert (200 mA konstant, ~16 V, 4 h).


Mix 1	Mix 2
200 ng gen. DNA 20 pmol Oligonukleotid (sense) 20 pmol Oligonukleotid (antisense) 10 µl GC-rich Resol. Solution 1 µl 25 mM dNTPs ad 35 µl H ₂ O	1 µl Polymerase-Mix (2 U) 10 µl 5x PCR-Puffer mit DMSO 4 µl H ₂ O
PCR-Programm	
3 min 95 °C 30 s 95 °C 30 s 60 °C 60 s 72 °C 5 min 72 °C ∞ 4 °C	
	

Abbildung 6-2. PCR auf GC-reicher genomischer DNA. Mit Hilfe des GC-Rich PCR Systems (Roche Diagnostics) wurde das GC-reiche Exon 1 des Huntingtin-Gens amplifiziert.

6.2.2 Gerichtete Mutagenese

Das Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit (Clontech) dient der gerichteten Einführung von Mutationen in bekannte Sequenzen in doppelsträngigen Plasmiden, die eine singuläre Restriktionsschnittstelle aufweisen. Die Mutagenese erfordert neben dem Mutations-Oligonukleotid, das die gewünschte Mutation in die Sequenz einführt, ein zusätzliches Selektions-Oligonukleotid, das die singuläre Schnittstelle des Plasmids zerstört.

Im ersten Schritt der Mutagenese wurde das zu mutierende Plasmid denaturiert, so daß sich die Selektions- und Mutations-Oligonukleotide an die einzelsträngige DNA anlagern

konnten (Abbildung 6-3). Ausgehend von den Oligonukleotiden wurden die komplementären Stränge durch die T4-DNA-Polymerase vervollständigt und die Teilstücke durch T4-DNA-Ligase miteinander verbunden.

Da nun die nicht mutierten Plasmide durch Restriktion mit der Selektions-Endonuklease linearisiert wurden, wurden diese mit sehr viel schlechterer Effizienz bei der Transformation in reparaturdefiziente *mutS*-Bakterien (*E. coli* BMH 71-18 *mutS*) aufgenommen, so daß die mutierten Plasmide angereichert wurden. Reparaturdefiziente Bakterien mußten in diesem Schritt eingesetzt werden, damit die gewünschten Basenfehlpaarungen nicht korrigiert wurden. Während der sich anschließenden Übernachtskultur wurden die Plasmide repliziert, so daß nun Plasmide mit der Mutation in beiden Strängen und Plasmide mit der ursprünglichen Sequenz und intakter singulärer Restriktionsschnittstelle vorlagen.

Aus diesem Plasmidgemisch wurden wiederum durch Restriktion mit der Selektions-Endonuklease die nicht mutierten Plasmide mit der intakten Enzymschnittstelle linearisiert, so daß bei der abschließenden Transformation in *E. coli* DH5 α Plasmide mit gewünschter Mutation in beiden Strängen stark angereichert wurden. Aus den nach der Transformation erhaltenen einzelnen Kolonien wurde dann die DNA durch Mini-Präparation isoliert und auf die korrekte Mutation getestet.

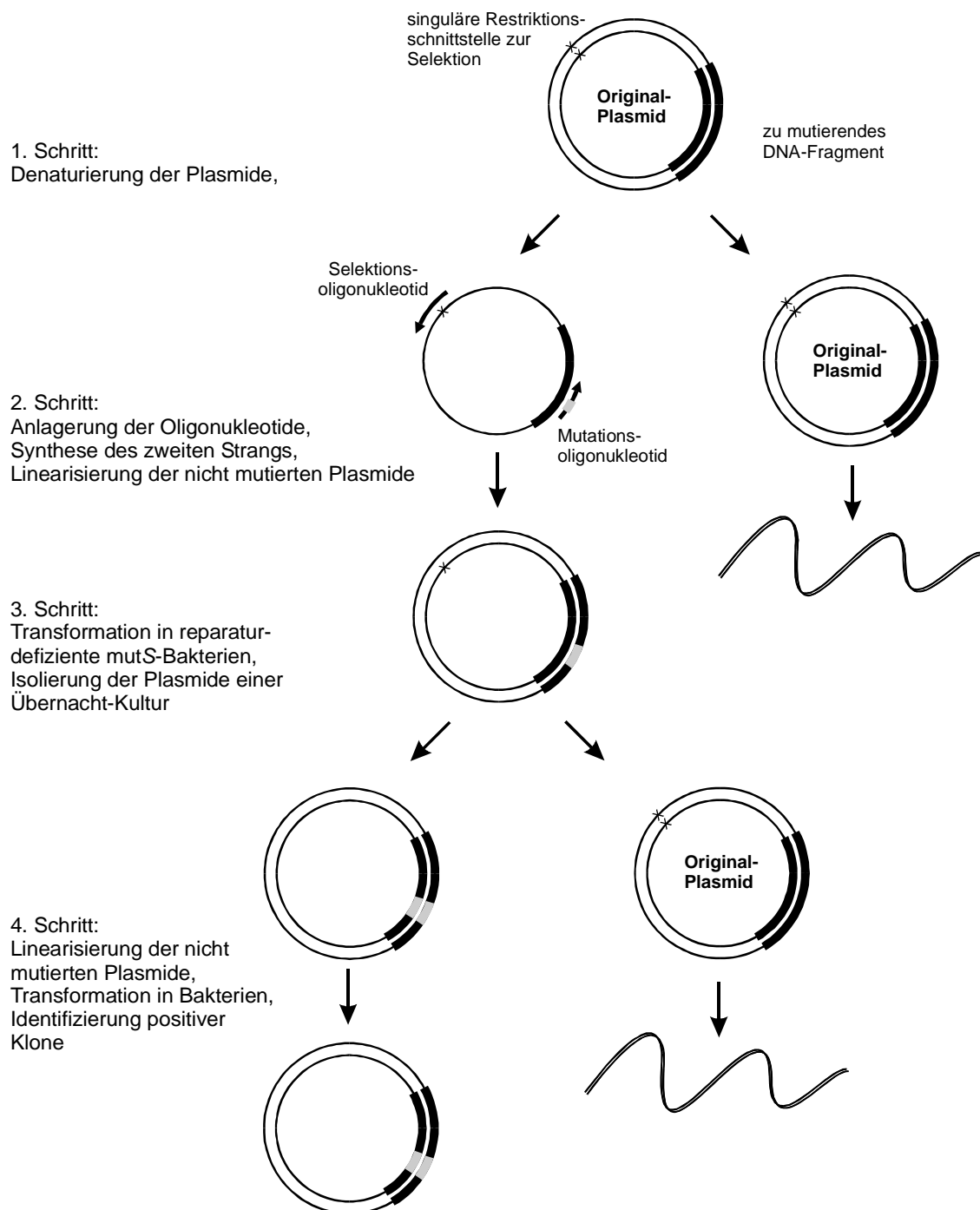


Abbildung 6-3. Ablauf einer gerichteten Mutagenese. Mit Hilfe von einem Mutagenese-Oligonukleotid wurde die gewünschte Mutation (grau) eingefügt. Indem eine singuläre Schnittstelle (X) im Plasmid durch ein Oligonukleotid zerstört wurde, konnten in mehreren Selektionsschritten Plasmide angereichert werden, die die gewünschte Mutation trugen.

6.2.3 Two-Hybrid-Bindungsanalysen

Mit Hilfe des Hefe-Two-Hybrid-Systems können Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* analysiert werden. Das Two-Hybrid-System nutzt den Transkriptions-Aktivator Gal4, der aus zwei Domänen besteht, die auch separat voneinander funktionell sind. Die Gal4-DNA-bindende Domäne (Gal4-BD) interagiert mit der GAL1-UAS (upstream activating sequence), während die zweite funktionelle Domäne (Gal4-AD) die Transkription aktiviert. Für eine Aktivierung der Transkription reicht es aus, wenn beide Domänen in eine räumliche Nähe gebracht werden.

Im Two-Hybrid-System werden in Hefen zwei Fusionsproteine aus der jeweiligen Gal4-Domäne und einem der potentiellen Interaktionspartner exprimiert. Binden diese Fusionsproteine aneinander, werden die Gal4-Domänen über die Bindungspartner miteinander verbrückt und aktivieren die Transkription der hinter der GAL1-UAS liegenden Reportergene. In verwendeten Hefestämmen Y190 und CG1945 wird das LacZ-Reportergen aktiviert, so daß die Expression von β -Galaktosidase durch farbige Substrate (X-Gal, ONPG) nachgewiesen werden kann. Zusätzlich wird das Reportergen HIS3 aktiviert, das den his3-negativen Hefestämmen Y190 und CG1945 ein Wachstum auf Histidin-defizienten Selektionsmedien erlaubt.

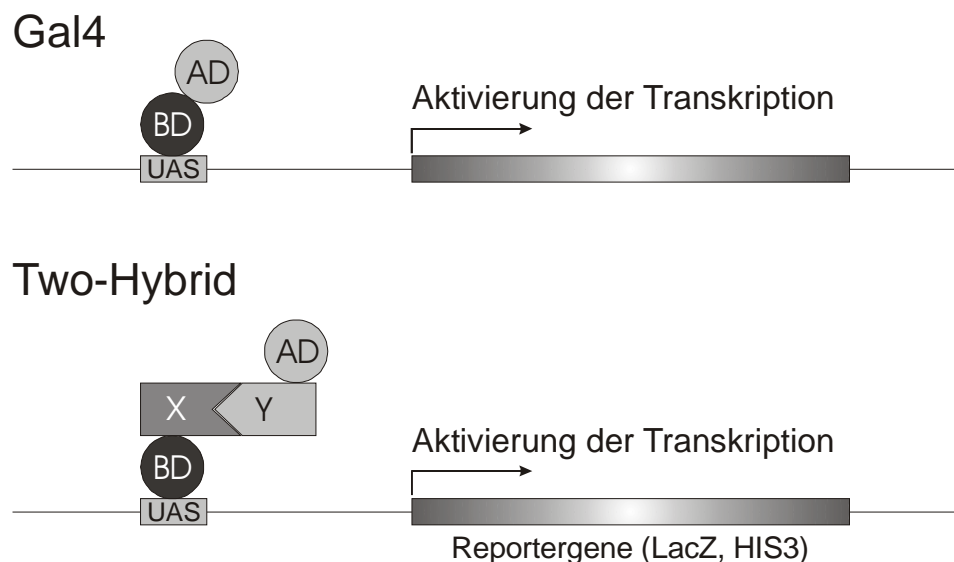


Abbildung 6-4. Aktivierung der Reportergene im Two-Hybrid-System durch Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die DNA-bindende und die transkriptionsaktivierenden Domänen des Gal4 Transkriptionsfaktors werden mit den Proteinen X und Y als Fusionsproteine exprimiert. Interagieren diese Fusionsproteine miteinander, wird die Transkription der Reportergene LacZ und HIS3 aktiviert.

Das verwendete Matchmaker2-Two-Hybrid-System (Clontech) basiert auf den Plasmiden pAS2-1, das die cDNA der DNA-bindenden Domäne, eine multiple Klonierungs-

stelle (MCS), das TRP1-Gen und das Amp^r-Gen enthält, und pACT2, das neben der transkriptionsaktivierenden Gal4-Domäne eine MCS, das Leu2-Gen sowie eine Ampicillin-Resistenz besitzt. Die Ampicillin-Resistenzen dienen der Selektion in Bakterien, während das Trp1- und das Leu2-Gen die Selektion positiver Klone von TRP und LEU-negativen Hefen auf Leucin- und Tryptophan-defizienten Selektionsmedien erlauben.

Die Hefen wurden mit einer modifizierten Lithiumacetat-Methode transformiert (Elble, 1992). Hierzu wurden 1 ml einer Über-Nacht-Kultur der Hefen abzentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl abgenommen. Nach Hinzufügen von 2 µl Lachsspermien-DNA wurden die Hefen mit der Pipettenspitze resuspendiert. Anschließend wurde 1 µg DNA je Plasmid zu den Hefen gegeben und sorgfältig gemischt. Nach Zugabe von 0,5 ml PLATE-Lösung (40,5 % PEG 4000, 100 mM Lithiumacetat, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) und 20 µl 1 M DTT wurde jeweils gut gemischt und die Suspension 6-8 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Erwärmung für 10 min auf 42 °C wurden die Hefen kurz abzentrifugiert, der Überstand bis auf 100 µl entfernt und die resuspendierten Hefen auf Selektionsmedien ausplattiert.

Nach 3-5 Tagen Inkubation der transformierten Hefen wurde die Aktivierung der Reportergene durch das Wachstum auf den Selektionsmedien (HIS3) bzw. durch Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität (LacZ) detektiert. β -Galaktosidase katalysiert die Umwandlung von X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Galaktopyranosid) und ONPG (o-Nitrophenylgalaktosid) zu Farbstoffen, die durch Filter-Tests oder photometrisch nach Protokollen des Herstellers (Clontech) analysiert werden können.

6.2.4 Allgemeine proteinchemische Methoden

SDS-PAGE und Western Blot

Die Größenfraktionierung von Proteinen erfolgte unter reduzierenden Bedingungen in 10 %-SDS-Polyacrylamidgelen oder 4-12 %-Gradienten-SDS-Polyacrylamidgelen nach dem Protokoll von Laemmli (1970).

Für Western Blot Analysen wurden die Gele nach der SDS-PAGE in einer Naßblotkammer (Hoefer/Amersham Pharmacia Biotech) 12 h bei 125 mA und variabler Spannung in Boratpuffer (50 mM Borsäure, 5 % Methanol, pH 8,5) auf PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) transferiert. Mit aufgetrennte Protein-Marker-Gemische (Fluka, Roche Diagnostics) wurden reversibel mit Ponceau S angefärbt und auf der Membran markiert. Anschließend wurden freie Proteinbindungsstellen der Membran mit 5 % Magermilchpulver in 0,1 % Tween 20 in TBS (TBS/Tween) blockiert. Die Detektion einzelner Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern und HRP-gekoppelten IgG-spezifischen Sekundärantikörpern, die in 2,5 % Magermilchpulver in TBS/Tween gelöst waren.

Anschließend wurden die Antikörper-markierten Proteine durch eine HRP-katalysierte Chemolumineszenzreaktion auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht (ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine wurden die in Kapitel 7.6.3 aufgeführten Standard-Proteinmischungen verwendet.

Konzentrationsbestimmungen von Proteinen

Proteinkonzentrationen wurden durch einen Bradford-Nachweis (siehe Harlow und Lane, 1988) bestimmt oder mit einem Amidoblack 10 B-gefärbten „Dot Blot“ auf PVDF-Membran abgeschätzt. Rinderserumalbumin in verschiedenen Konzentrationen wurde als Standard verwendet.

6.2.5 Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine

Zur Herstellung Proteine in *Escherichia coli* wurde das Glutathion-S-Transferase-System (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Hierzu wurden die kodierenden cDNA-Bereiche der aufzureinigenden Proteine so in das Leseraster der Glutathion-S-Transferase der Expressionsvektoren der pGEX-Reihe kloniert, daß die entstehenden Vektoren nach IPTG-Induktion Fusionsproteine aus GST und dem gewünschten Protein exprimieren.

Diese Expressionsvektoren wurden in Protease-defiziente *E. coli* BL21 transformiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach 1:50-Verdünnung in LB-Amp-Medium wurden die Bakterien bei 28 °C bis zu einer optischen Dichte (600 nm, OD₆₀₀) von 0,5 weiterinkubiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde anschließend durch IPTG-Zugabe bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mmol/l induziert. Nach 4-6 h Inkubation bei 28°C wurden die Bakterien durch Zentrifugation gesammelt und in 1/25 Kulturvolumen eiskaltem PBS mit 1 mg/ml Lysozym bei 4 °C lysiert. Nach Sonifizierung (2x 10 s, Ultraschallprozessor Up 200s, Dr. Hielscher GmbH) wurde dem Lysat 20 % Triton X-100 in PBS bis zu einer Endkonzentration von 1 % hinzugefügt und das Lysat 30 min bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Nach Zentrifugation (20000 x g, 15 min bei 4 °C) wurde der Überstand mit einer entsprechenden Menge Glutathion-Sepharose 4B versetzt und 2 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Matrix dreimal mit 50-fachem Bettvolumen eiskaltem PBS gewaschen und in eine Mobicol-Säule (Mobictech) gefüllt. Die Elution der Fusionsproteine erfolgte in vier Fraktionen mit je einem Bettvolumen 10 mM reduziertem Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. Während aller Aufreinigungsschritte wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert.

6.2.6 Herstellung spezifischer Antikörper

Zur Herstellung spezifischer Antikörper wurden Kaninchen durch Pineda Antikörper Service mit je 500 µg GST-Fusionsprotein immunisiert. 61 Tage nach Immunisierung wurde der Titer und die Spezifität der Seren im Western Blot analysiert.

6.2.7 Protein-Interaktionsnachweis („Pull down“)

Spezifische Interaktionspartner immobilisierter Proteine werden aus Proteinextrakten präzipitiert, mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und durch Western Blot analysiert.

Hierzu wurden Gewebe oder Zellen mit einem Braun Homogenisator oder durch Ultraschall in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1 mM MgCl₂, pH 7,4 mit 1 % CHAPS und Proteaseinhibitoren homogenisiert (4 ml/g Gewebe). Nach Zentrifugation (20000 x g, 30 min bei 4°C) wurde der Überstand bis zu einer Endkonzentration von 0,01 % mit Triton X-100 versetzt und 24 h gegen 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1 mM MgCl₂, pH 7,4 dialysiert. Nach Zentrifugation des dialysierten Lysats und erneuter Zentrifugation (20000 x g, 30 min bei 4°C) des Überstands wurde dieser mit an Glutathion-Sepharose 4B immobilisierten GST-Fusionsproteinen (GST, GST-PACSIN 1, GST-PACSIN 1ΔSH3 und GST-SH3^{PACSIN1} bzw. GST, GST-Endophilin A1, A3 und B1) versetzt und 12 h unter Kopf-über-Kopf-Rotation bei 4 °C inkubiert.

Anschließend wurden die Matrices ausgiebig mit PBS/0,1 % Triton X-100 gewaschen. Die spezifisch gebundenen Proteine wurden mit SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

6.2.8 Protein-Interaktionsnachweis („Overlay“)

Zur biochemischen Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen („Overlay“) wurden Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Anschließend wurden freie Bindungsstellen mit 5 % Magermilchpulver, 0,1 % Tween-20 in TBS blockiert.

Diese Membranen wurden über Nacht mit Lösungen von Proteinen inkubiert, an deren Bindungspartnern man interessiert war, denn in einem „Overlay“ binden die Proteine aus der Lösung spezifisch an ihre Bindungspartner, die auf der Membran immobilisiert sind. Zur Detektion der PACSIN 1-Bindungspartner wurden entweder Hirn-Proteinextrakte, die PACSIN 1 enthielten, oder gereinigte GST-PACSIN 1-Fusionsproteine verwendet. Nach der Inkubation über Nacht wurde das an die immobilisierten Proteine gebundene PACSIN 1 mit PACSIN 1-spezifischen Antikörpern und HRP-gekoppelten Kaninchen-IgG-spezifischen Zweitantikörpern nachgewiesen.

6.2.9 Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen wurden mittels FuGene 6 (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben transfiziert. Hierzu wurden NIH 3T3 Fibroblasten in einer 6-Loch-Zellkultur-Schale bis zu einer Konfluenz von ca. 75 % bei 37 °C in 5 % CO₂-haltiger Atmosphäre in DMEM, 10 % FCS, 0,02 mg Streptomycin/Penicillin, 2 mM L-Glutamin) inkubiert. Anschließend wurden 6 µl FuGene 6 mit 94 µl serumfreien DMEM gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und zu 2 µg Expressionsvektor-DNA gegeben. Das Gemisch wurde nach 15 min zu den Zellen hinzugegeben. Nach 24-48 Stunden Inkubation der Zellen bei 37 °C in einer 5 % CO₂-haltigen Atmosphäre wurde die Proteinexpression durch Immunfluoreszenz oder durch Präparation von Proteinextrakten für „Pull Down“-Experimente analysiert.

6.2.10 Immunfluoreszenz-Analysen in eukaryotischen Zellen

NIH 3T3 Fibroblasten wurden in 6-Loch-Zellkultur-Schalen auf 10 mm sterilen Deckgläsern wie zuvor beschrieben herangezogen und mit Expressionsvektoren für HA-18-1, HA-Endophilin B1 oder Myc-PACSIN 1-Fusionsproteine transfiziert. Nach 24-48 Stunden wurden die Deckgläser mit den anhaftenden Zellen entnommen, die Zellen mit PBS gewaschen, 10 min mit 2 % Paraformaldehyd fixiert und 1 min mit 0,2 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen das HA-tag (Roche Diagnostics), Myc-tag (Santa Cruz Laboratories), Dynamin (BD Transduction Laboratories) oder Clathrin (BD Transduction Laboratories) in PBS, 0,02 % Triton X-100 inkubiert, 3 x 5 min in PBS, 0,02 % Triton X-100 gewaschen und mit IgG-spezifischen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern angefärbt. Nachdem die Zellen 3 x 5 min mit PBS, 0,02 % Triton X-100 gewaschen wurden, wurden die Deckgläser mit einem Tropfen Fluorescent Mounting Medium (Dako) auf einem Objektträger fixiert. Die angefärbten Proteine wurden durch konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie (Leica) dokumentiert.

6.2.11 Endozytose-Nachweis mittels Durchflußzytometrie

Die Endozytose des Transferrinrezeptors wurde mittels Durchflußzytometrie in Abhängigkeit von der Überexpression von PACSIN 1, PACSIN 3 und Endophilin B1 untersucht.

Hierzu wurde die cDNA des rot fluoreszierenden Proteins DsRed mit den Oligonukleotiden DsReds (Mfe I) und DsRedas (BspE I) und dem Plasmid pDsRed-N1 (Clontech) als Matrize in einer PCR-Reaktion amplifiziert, mit Mfe I und BspEI geschnitten und so in den Mfe I/EcoR I geschnittenen Expressionsvektor pEGFP-C1 (Clontech) kloniert, daß es dort das grün fluoreszierende Protein EGFP ersetzt (pRed-C1). Anschließend wurde

die cDNA von PACSIN 1, PACSIN 3 und Endophilin B1 in den Vektor pRed-C1 kloniert, daß in transfizierten Zellen Fusionsproteine mit aminoterminalen DsRed exprimiert werden.

Zur Quantifizierung der Transferrin-Aufnahme in PACSIN 1, PACSIN 3 oder Endophilin B1-überexprimierenden Zellen wurden NIH 3T3 Fibroblasten mit den Expressionsvektoren pRed-C1/PACSIN 1, pRed-C1/PACSIN 3 oder pRed-C1/Endophilin B1 mittels FuGene 6 (Roche Diagnostics) transformiert und 48 h bei 37 °C in 5 % CO₂-haltiger Atmosphäre inkubiert. Nach 20 min Inkubation in serumfreiem Medium wurden die Zellen 30 min mit 25 µg/ml FITC-konjugiertem humanem Transferrin (Sigma) in 5 % FCS-haltigem Medium fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit HBS (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,5 mM MgCl₂, pH 7,2) gewaschen, mit 1 % Trypsin in HBS von der Zellkulturschale abgelöst und final einmal mit HBS gewaschen.

Mit einem FACSCalibur (Becton Dickinson) wurde das über den Transferrinrezeptor endozytierte FITC-Transferrin (FL1) in Abhängigkeit von der Expression der rot fluoreszierenden Fusionsproteine DsRed-PACSIN 1, DsRed-PACSIN 3 bzw. DsRed-Endophilin B1 (FL2) in 5-10x10³ Zellen ausgewertet. Zur Auswertung wurden die Zellen in drei Gruppen von geringer (40-100 Fluoreszenzeinheiten, FU), mittlerer (100-150 FU) und starker Überexpression (150-1000 FU) eingeteilt und der Mittelwert der Transferrinaufnahme jeder Gruppe gebildet. Der Mittelwert für nur schwach überexprimierende Zellen wurde auf den Wert 100 normalisiert und die Werte der mittel und stark überexprimierenden Zellen daran angepaßt.

7 Anhang

7.1 Verwendete Abkürzungen

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Adaptor (binding) protein
ARF	ADP ribosylation factor
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAR	Bin1-Amphiphysin-RVS
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CALM	Clathrin assembly lymphoid myeloid leukaemia protein
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalovirus
CoA	Coenzym A
COP	Coat protein
CT	Carboxyterminus
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium/mix
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EH	Eps 15 homolog
ENTH	Epsin N-terminal homology domain
Eps15	EGF-Receptor Pathway Substrate clone 15
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	Expressed sequence tag
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GE	Gewebeextrakt
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HA	HämAgglutinin (tag)
HD	Huntington's disease

HRP	Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertami
LPAAT	Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase
mRNA	messenger RNA
NIH	National Institutes of Health
NPF	Asparagin-Prolin-Phenylalanin
NSF	N-Ethylmaleimid-sensitives Fusionsprotein
NT	Aminotermminus
NVP	Neural Visinin like protein
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenylgalaktosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PH	Pleckstrin homolog
PRD	Prolinreiche Domäne
PSTPIP	Pest phosphatase interacting protein
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RZPD	Ressourcenzentrum Primärdatenbank
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Src homolog
SNAP	Soluble NSF attachment protein
SNARE	SNAP Rezeptor
SNIP	SNAP interacting protein
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
VHS	Vps27p Hrs STAM
VILIP	Visinin like protein
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Galaktopyranosid
ZMMK	Zentrum für molekulare Medizin Köln

7.2 Plasmide

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
pAS2-1	Clontech	Two-Hybrid-System
pACT2	Clontech	Two-Hybrid-System
pBluescript KS(+)	Stratagene	Klonierungsvektor
pBluescript SK(+)	Stratagene	Klonierungsvektor
pcDNA3	Invitrogen	eukar. Expressionsvektor
pCRII	Invitrogen	Klonierungsvektor
pHA-CMV	Clontech	eukar. Expressionsvektor
pGEX-3X	Amersham Pharmacia Biotech	bakt. Expressionsvektor

7.3 cDNA-Banken und cDNA-Klone

Eine embryonale Maus-cDNA-Bank in Form von vereinzelt, auf Nylon-Membranen aufgetragenen Klonen wurden vom Ressourcenzentrum RZPD erhalten (RZPD Bank 559). Die cDNA-Klone wurden in *E. coli* transformiert erhalten.

Klon	RZPD Klonnummer
cDNA 18-1 #11	MPMGp559D2174Q2
cDNA 18-1 #12	MPMGp559N0785Q2
cDNA 48-9 #2	MPMGp559A07143Q2
cDNA 48-9 #5	MPMGp559O08261Q2
cDNA 48-9 #6	MPMGp559L2331Q2

7.4 cDNA-Sequenzen

7.4.1 Two-Hybrid-Klon 18-1

```

1  GCTGAGAGGGCGGAAGGCGCCCTCCCGCCGCTGGGCCCCGGGCACCGGGCGCCGGGCCGG
61  GGTCCCTTCCCGCCGGCGGCGAGCGCCGGCTGCTTTGTTTGGCCCCGCTCGGCGTTGAGG
121  GGTGATCGTGCCGGGCATTGCGCCGGGAACGCGCGGCAGGAAGCGCGACCGATCGCACC
181  GGGGACGCGCGGGGACCCAGGAGTCCGGCCGCGGCAGGGCCGCTGACGATACCGAGGA
241  GAGAGCCGGAGCGCGCCGCGGGCTCCTGGTGGTGGGCCCCGGACGCCCGTGAGCACAGA
301  CCTCCCGTGCAGGGGGGCGATGTTCCCTGGCCCCGAGGCTCTTCGGGGCCCGGGGT
361  ATCCCGCCGTGGGACCAAGGGCCCCCGCAGTGGGCGACCCCCAAGGCTGCTCCATGGAGA
                                     M E T      3
421  CTCTGTGTCTCCTCCCGCCTGGCAGTGCCCGCTTCCCGCGGGGGTCTCCCTGCTCGC
      L C P P P R L A V P A S P R G S P C S P      23
481  CTACGCCCCGTAAGCCGCTCGGGGGACCCAGAGTTTCCCACTGTGCCTGCGTGCCC
      T P L K P R R G T P E F S P L C L R A L      43
541  TCGCCTTCTGCGCCCTTGCCAAACCTCGGCCGTCTCCTGGGCTGGGGCTGGAGAGC
      A F C A L A K P R P S S L G L G P A S P C T G G W A      63
601  TGGCGCCGCGGACCCCGGTGCTGCTGGGCCCCCGGCTCGCCATGCACAGGAGGCTGGG
      A P R T P V L L G P P A S P C T G G W A      83
661  CCGCGGACGGCCTGAAGCACCTCGGGGGACAGGCCGGGCGGCGAGCGACGTGAGCTCCC
      A D G L K H L G G Q A G R P S D V S S P      103
721  CGGCCCGCGAGGATGCAGACGTGCGGTGTGCCAGGCGGTGGAGAGGAGGAGAGGGCG
      A R E D A D V A V C P G G G E E E E G G      123
781  GAGCGGCTTCCCGCACTTCGGCGCTGGTTCCTGCGCACCTCCGGGCCGCTGCCCTGCTC
      G G F P H F G A G S C A P P G R C P A P      143
841  CCCTGCGTCTCAGGACTCTCCGACCAACCCCGCTGGTCCCCGCCAGGCCAGCCCGGG
      L R P Q D S P T N P A W S P P R P A R G      163
901  GTCTTGATGCAGTAGCAGTCCGCCCCTTAGAGCCGGCTCCCGCCTCGTCGCCCACTG
      L D A A S S P P L E P G S P P P S P P A      183
961  CGGGCTCTCCCGGAGCCTGCGCCTTCCGAGCAGCCTGTGCCGGCTCCGAGGCTCCAG
      G L S P E P A P S E Q P V P A S E A P G      203
1021  GGGGTGGAGACCTGCGCCGACCGCGCTGAGGCACCCGCGCTCAGCCCTCGTCCGCGAG
      G G D P A P T A P E A P A L S P S T A D      223
1081  ACGCAGCACCGGACCCCGCCGCGATCTCCGCCAGGAACATTTCAACCGCCTGATCCGCC
      A A P D P P R D L R Q E H F N R L I R R      243
1141  GCTCGAAACTTTGGTGTACGCGAAGGGTTTCGCCCTGGACACTCCAAGTTTGCGCCGAG
      S K L W C Y A K G F A L D T P S L R R G      263
1201  GGCCCGAAGCGCCCGCGGCAAGCCCGTGGAGCAGCCAAGAAACGAGGCGGCGCAGCGC
      P E R P A A K A R G A A K K R R R P A P      283
1261  CGCCCCCGCCAGTGTGACGCCAGCGCGCCCGTCCCGACGCTTCTTACATCGAGCACCT
      P P P S V Q P R R P V P T L P T S S T F      303
1321  TCAGCCTCCTTGACTGCTTCCCCGTGCCCCAGCTCTGGTGGTGGAAAGAGAACGGAGACC
      S L L D C F P C P P A L V V E E N G D L      323
1381  TAGGGCCGGCTTCTCGCTTCGCTCCAGGGAGACGCCAAGCCGCGCCCTGCCACCCGC
      G P A S S L R L Q G D A K P P P A H P L      343
1441  TGTGGAAGTGGCAGATGGGAGGACCCGCTGTCCCTGAGCCCCGGGTCTCAATCTGGT
      W K W Q M G G P A V P E P P G L K S W      363
1501  GGGTCAACTTGAAAGAACTATGAGCGTCGGACCTCTTCTACCCGGGGGCAAGTTGGGTTT
      V N L E E L *      370
1561  CCCGGACAGACTGAGGGCTCCAGGAGGAGCATCGATTCTGAAATTTGGCTGATCTTTGC
1621  TTTGCATTTTATGGGCTGTGGCCCGCGGACCTCAAATGACAGTGATCTTCAAGCACCCG
1681  AGAGGTGCTCCGGCTGATGCTCTTTCTACTCATCTTTGTGGAAGATCCAAGGACTGGCGT
1741  CCGGGAAAGCCTGCAGAAAGCTTAGTGACCATCTCCGTCCTCCCTGCGGGCGGGCAGAGC
1801  CTTACCCGAGGGGAGCACAGCGCTAAGGCCGAAGACCAAAAGAAAGGGACAGAGGGA
1861  CGGACCTTGGTGATGGACAAACCGGTTGTTCCATGTTGAATGAGGGTCAGTTTAGCGG
1921  TGTGGGGGCTGTGGTTGGGTTTGAAGGTGATTGACAGCTCCCTGGGGGCATCCCCACC
1981  CCCCAGTCCCAGACCTTTAACCTTTACACCTCCCTCTTTCTCTCCCTAGTCTCTCCC
2041  CTCCCCAAGTTCAGGTGATTTTCCCTTGTCAGATCTTCAGTCCCAGCCAGCAGACTTTA
2101  CCCTTTGTCCAGTTTGGAGTTTCCCTTTGCCGGAAGGTTGGATGAAGGAAAGAGACCT
2161  CCAGCCTCAGCGTTCTCCTCACATCTTGAGAGGAAAGGAGGAGAGGGCCATGCTGTGTG
2221  GCCCAAGGCTGGCTTTCGCCGGGAAGGAGCCAAAACTCCCGGGGAAATGATGGAAGA
2281  TGGAATAAATCAATAAAATCAGACCAAAC 2309

```

Abbildung 7-1. Vollständige Sequenz von Klon 18-1. Stop-Kodons in der 5'-nichttranslatierten Region sind fett abgebildet. Potentiell SH3-bindende PXXP-Motive sind unterstrichen dargestellt. Mögliche Polyadenylierungssignale am 3'-Ende sind kursiv und fett hervorgehoben.

7.4.2 Endophilin B1

```

1   CCGGACGCGACCTCGGTCCTCCCGTGGCTCGCAGCTGCTCGGCGACGCGACAGGCCAGCGT
61  GTGAGCGGAGAGGCGCGCTCGCGGGCGCGCCCTCTCCCTCCCGCGCTCCCGCGC
121 AGGAAACGACAGCTGCGCGGGGCTGGCGCGCCTCCGCGCACTACCAGCTCGCGCCGCGC
181 CGTCGCGCTCGCGCGCGCCAGCCGCGCGCGCTCCCGCGCTCCCGCTAGCGCA
241 GCGGCGGCTGCGCGGCTGCGCGCGCATGAACATCATGGATTTCAAGTGAAGAAG
      M N I M D F N V K K
301 CTGGCGGCGACGCGGGCACCTTCTCAGCGGGCGTGCAGTTACAGAAAGAAAGCTT
      L A A D A G T F L S R A V Q F T E E K L
361 GGCAGGCGAGAAAGACAGAACTGGACGCTCACCTGGAAAACCTCTTAGCAAGCTGAA
      G Q A E K T E L D A H L E N L L S K A E
421 TGTACCAAAATATGGACAGAAAGATAATGAAGCAGACCGAAGTGCTGTTCAGCCAAAT
      C T K I W T E K I M K Q T E V L L Q P N
481 CCAATGCCAGGATAGAAGAATTGTTTATGAGAACTGGATAGAAAGCACCAAGTCGT
      P N A R I E E F V Y E K L D R K A P S R
541 ATAAACAACCCGGAACCTTTGGGCAATATATGATTGATGACGGAACGAGTTGGCCCA
      I N N P E L L G Q Y M I D A G T E F G P
601 GGCAGAGCTTATGAAATGCCCTTAAATGTGGAGAACACAGAAAGCAATGGAAACA
      G T A Y G N A L I K C G E T Q K R I G T
661 GCTGACCGAGAGCTGATTCAAAACATCAGCCTTAAATTTCTCCTCCTTTAAGAACTTT
      A D R E L I Q T S A L N F L T P L R N F
721 ATAGAGGGGATTACAAAACATCGCAAAAGAAAGGAACTATTACAGAAATAAGAGACTG
      I E G D Y K T I A K E R K L L Q N K R L
781 GATTTGGATGCTGCAAAAACAAGACTAAAAAGGCAAAAGCTGCAGAACTAAAGTTCA
      D L D A A K T R L K K A K A A E T K S S
841 CAACTAACTCCGCGCCCTGAAGGAGATAACATTATGATTGGGCGAGGAAAGTGACA
      Q L N S A R P E G D N I M I W A E E V T
901 AAATCTGAACAGGAATTGAGAATAACTCAAAGTGAATTGATCGTCAGGAGAGATTACC
      K S E Q E L R I T Q S E F D R Q A E I T
961 CGACTCTGCTTGAGGAATCAGCAGTACACAGCCCATCATCTCCGCTGTCTGAATGAC
      R L L L E G I S S T H A H H L R C L N D
1021 TTTGTAGAAGCCAGATGACTTACTATGCACAGTGTTACAGTATATGTAGACCTACAG
      F V E A Q M T Y Y A Q C Y Q Y M L D L Q
1081 AAGCAACTGGGAAGTTTCCATCCAAATATCTTTCTAAACAACATCAGACCTCTGGGACA
      K Q L G S F P S N Y L S N N N Q T S G T
1141 CCAGTGCCATATGCTTTGTCAAATGCAATTGGCTCTCTGCCAGGCTTCAACGGGTAGC
      P V P Y A L S N A I G P S A Q A S T G S
1201 CTTGTAATCACCTGTCTTCAACCTCAATGACCTTAAAGAAATCCAGCAACAACAGGAAG
      L V I T C P S N L N D L K E S S N N R K
1261 GCTAGGCTCTCTATGATTATGATGCTGCAAAATAGCACTGAACTGTCACTCTGGCCGAT
      A R V L Y D Y D A A N S T E L S L L A D
1321 GAGGTAATCACTGTGTTCAGTGTGTTGGAATGGAAGTCCGACTGGCTAATGGGAGAGAGA
      E V I T V F S V V G M D S D W L M G E R
1381 GGAATCAAAGGGCAAGGTGCCAATTACCTACTTGAACCTTCAATTAACACAGGAGA
      G N Q K G K V P I T Y L E L L N *
1441 CCACGAGAGTTTACCCATCACAACCATATTTATATAATAACTCTAAAGCAGGTTTAA
1501 ATATCTTCCAATGTAATGTCAAGAGACTGAAAAGAAAATATAAGCCATCAGAAA
1561 CTGGCCATTCTGCCAATAAACTGCATGGTTAATCTCTTATTACAGAACTATGTTAGCG
1621 ATTTTCATGACAGGAGTGTTTCTTAAACAATTTCTCTTCTACTGAGGTTTACTAACAAG
1681 CAACCTTCTACTTTTGAGCCCCAACTTAAAGTGAAGGATTCTTTTCTACTGAATTTTC
1741 ATTAACAGGAAGCTTTTCTTTTATGCAAAATAAAATTTATGTGCATGATACCAAGTACT
1801 CATTTATAGATACAATAGCCAAAGATAAAGTAAAAACTCTCTTTTACCTTGTCTGCCCA
1861 ATAGGAATCAGATGACTTAAATACTAGGCCTTACTAGGCTCTCTGGCTTTGGAGTTTTC
1921 CTGTGGTTGGGTTGGGTTTGGTTTATTTATGTTTATTAACACTAGGATAGTTCTTTTA
1981 AACCTGAGTCTTGAAAAGTATTACCTTATTTATATAATTTGTTAAGATTGCAGAACACTG
2041 GGCAGCAAAATTCATTCATAAGAAATATCTTCAGATTTATCAGTTGCCAAAATTTGATGAC
2101 CAATCAGAAATGCAATCCATTGAGAAGATACTACACTACAGTAAAGATTGTTGTTGACCA
2161 ATGATTGTGTATAAAATACAGATTGGTGCAGCAGCCTTATTATAGGCCAAGTCATGCAG
2221 TGCATGCAGTCTGTCTTCAGCAGGATCTTGGTTATGTGGCGCGCGCTCGGAGGTTGCT
2281 AATGACACATTTGGAATAGAGAATTGCTCTGAGGACCATGCTATCCATCAGCAAAAGCTT
2341 GCTGTGAATTGCAGTTGAGGAATCTTTGGTTAGGCTTTCATGTCTCACTCGTTTCATCA
2401 TCCATCCATTCAAAAGACATTTATTGAGGGCCAGGTACTTTGTTGATCAACTAAGTACAC
2461 CTCTAACAGGATTGATATTGTGATGGAAGAAATAAAGTGTGTTGTTAGGAATTAACCTG
2521 GTTTGGGCTGAGAAGTCAGAAGTAGAATCCACGCTAGAAGGAAAGACTGTTTGGGGCC
2581 TAGAACCAACAGAAACATAAAATTTCCAGAGTACCTTAGTAGCGGAGTACAAAGGTGTAG
2641 TTCACTTACTCAGAGGCTTGTAAACTTTTGAGCCCTAAAGTACTATTAAATAGCACT
2701 TTAAGCATCCATTGTTGTTAAGAGCTTGGTAAACATGGAAAACCTGGTCTTGGTCTCA
2761 GCATTAAAAACCCCTTTCTCTGCAGTCAGATAAAATCTCTGCAGTTTTCTAGTTCTGTA
2821 AGACTCTGACTTACACTTGAGTTACATCTTGGAGGACTCCAGAGACAACAGAGATGCTA
2881 GTGTTCTAGGGAATCAAGTGAATGAGGTTTGTGTTCTTTTCTCTCAGAAAGGAAGT
2941 TTTATAGCNTAAAGGCCATCTGTATATTTGTCCAAAATAGGTTTTGAGGAGCTATAG
3001 AAATTTGGGTGACTTTAAACAGCAGCTTCAAGTCAGCAAAATTCAGTTTATGGGAAATAGA
3061 TCAGTGCAGGAGAAAATATAAATATGGACTGAATTTGTTCTGGTTTGTATCCTCACATAT
3121 TGGGCTCCCTGGAGTTCAACTCAGATTAGAGCTGCCATTTTATCAGTATAATGGGAA
3181 TAAGCATTTGTTACCTAGCAGGAGACTATTCACAAGTATTACTTTGTGTTTGTGCTTTT
3241 AGGCAAGACCTGGCATATAGTACATATGCTGTAAGCCAGATGTCTCTTTTCAGTCCCTG
3301 ACACATGGGCGAGTGAAGAACATGTCTGACCTCTGTGCTGTGCTTGCCCTTCAGCCCAT
3361 TCTCCACCTCCGCGAAACCGAGCAGAGCCTCTCACCCGCGCCACACTCTCAGCCCGC
3421 CCACACTCTCACCCGCGCCACACCCCTCACCCCTGCCCCACACGCTCTCTGTGTAAGCT
3481 CTGTAGCAGGACCCGGTCTTCCAGCAGGAGTGTGTTTACTGAAGATGCGCTTAGACAC
3541 AAGAGGACCCACCCAGGCTGTAGTGTCTAAGAGGAGCAAGGCGCTTTCTGTACCTTTG
3601 TCTATTATCGATCCAAGTAACTTTAGGCTGTCTTTTGTGTTTCAATTTTTGTTTTC
3661 ATGAGCTTTATTGTTTGGTTGGGAGTTTCTTTAAATTTGGTTTGAATTTAAAGTTATGA
3721 GTTTAGTTTGTGCTCAGCTAAAGGCCCAAGGAAATGTGTATCATAGAAAGAAAACCTTTA
3781 GAAAACCCATTAATTCGTGTGTAAATCAAAGTTATTTAAATAAATCTTTGGCGCTTGAG
3841 CATAAATCAGTAGCACATTAATGAGTGGAGGTCATATATTCAATAAAATAAATAATGAG
3901 ATGTTTATAGGCCCTCTACAACTGAAAAGAAAGTGGATTTAACTACCTTTGCTCTTAA
3961 AGGAATCTGACCCACATGGTTATAGTTAAACAATTTTTTCATGGTGCTAATC 4012

```

Abbildung 7-2. Vollständige Sequenz von Endophilin B1. Die SH3-Domäne ist unterstrichen dargestellt. Potentiell verwendete Polyadenylierungssignale von zwei verschiedenen mRNA-Längen sind kursiv und fett hervorgehoben.

7.5 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-...-3')	Verwendung
18-1as1318 (EcoRI)	GCG CGC GAA TTC GTG CTC GAT GTA GGA AGC GTC	Sequenzierung
18-1as1418	GAT GGT CAC TAA GCT TTC TGC	Sequenzierung
18-1as226	TTT GGC AAG GGC GCA GAA GG	Sequenzierung
18-1as87	AGA GTC TCC ATG GAG CAG CC	Sequenzierung
18-1as922 (EcoRI)	GCG CGC GAA TTC GAC TGC TAG CTG CAT CAA GAC	PCR
18-1s401ATG (EcoRI)	GCG CGC GAA TTC ACA AG CTG CTC CAT GGA GAC	PCR
18-1s512	CTC AGG ACT CTC CGA CCA AC	Sequenzierung
18-1s72	GCT CCA TGG AGA CTC TGT GTC C	Sequenzierung
18-1s971	CTA CAT CGA GCA CCT TCA GCC	Sequenzierung
3'-CDS	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA C(T) ₃₀ N ₋₁ N; N ₋₁ =A, G, C, N=A, C, G, T	RACE, RT
48-9#6as138	CTA TAA CCA TGT GGG TCA GAT TCC	Sequenzierung
48-9#6as540	GCT CCT TTT AGC ACT ACA GCC	Sequenzierung
48-9as1235	AGG TCA TGG AGG TTA GAA GG	Sequenzierung
48-9as197	GCA GCT GTC GTT TCC TGG CG	Sequenzierung
48-9as345	TCC ATG ATG TTC ATG CCG GG	Sequenzierung
48-9as349	GAA ATC CAT GAT GTT CAT GCC GGG C	Sequenzierung
48-9as608	GCT GTC CCT GGG CCA AAC TCA GTT CCT GC	Sequenzierung
48-9asdSH3 (Eco RI)	CCT GTT GCT GAA TTC TTT AAG GTC	PCR
48-9cDNAas1213	CAT TCA CTT GAT TCC CTA G	Sequenzierung
48-9cDNAs220	TGA GAT GTT TAT AGG CCC TC	Sequenzierung
48-9s152	CCT CCC GCC ACC TAC CAC GTC CGC C	Sequenzierung
48-9s1555	CAG AAA CTG GCC ATT CTG CC	Sequenzierung
48-9s1671	TAC TAA CAA GCA ACT TCT AC	Sequenzierung
48-9s2177	TAC AGA TTG GTG CGA CAG CC	Sequenzierung
48-9s775	AGA CTG GAT TTG GAT GCT GC	Sequenzierung
48-9sATG	TAT TAG GAT CCC CGG CAT GAA CAC CAT GG	PCR
48-9sATG (EcoRI)	GCG CGA ATT CAT GAA CAC CAT GGA TTT CAA CG	PCR
5'-CDS	(T) ₂₅ N ₋₁ N mit N ₋₁ =A, C, G; N=A, C, G, T	RACE
DsRedas (BspEI)	TCC GGA CAG GAA CAG GTG GTG GCG G	PCR
DsReds (MfeI)	CAA TTG TCG CCA CCA TGG TGC GCT CC	PCR
Gal 4 AD	TAC CAC TAC AAT GGA TG	Sequenzierung
Gal 4 DB	TCA TCG GAA GAG AGT AG	Sequenzierung
hHDasEx1 (BamHI, EcoRI)	TGG GAT CCC TAG AAT TCC GGT CGG TGC AGC GGC TCC TCA GCC ACA GC	PCR
hHDsATGno1 (BamH I)	TGC GGA TCC TCG ACA TGG CGA CCC TGG AAA AGC TGA TGA AGG	PCR
P1d14-3-3	GCG CGC GAA TTC GGA ACC ACC TGA GGT CCT CC	PCR
P1d26	GCG CGC GAA TTC CTG GGA TGT GGA TTC TAC AG	PCR
P1dNPF1	GCG CGC GAA TTC TCC GCT CTC ATC GTC TGA CC	PCR
P1dNPF2	GCG CGC GAA TTC GCC ACC ATT GGC CTC ATT GC	PCR
P1dSH3	GCG CGC GAA TTC TCA TAG AGT GCC CGT ACA CG	PCR
P1-N364D	GAT GAG AGC GGG GAT CCC TTC GGG GGC	PCR
P1-N376D	CCA ATG GTG GCG CGG ATC CCT TCG AGG	PCR
P1-P434L	GGC CTC TAT CTC GCG AAC TAC GTT G	PCR
P1sATGNcoI	AGA ATT CCA CCA TGG CTG GC	PCR
pBridgeMCS2as	CAC CTG GCA ATT CCT TTA CCT TCC	Sequenzierung
pBridgeMCS2s	CTT CGT GTA ATA CAG GGT CGT CAG	Sequenzierung
pCMV	GAT CCG GTA CTA GAG GAA CTG AAA AAC	Sequenzierung
pGex	GGC CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG	Sequenzierung
SMART II	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG	RACE
Sp6	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G	Sequenzierung
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA	Sequenzierung
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sequenzierung

7.6 Antikörper

7.6.1 Primärantikörper

Antigen	Antikörper	Spezies	Hersteller
Clathrin	monoklonal, Klon 23	Maus	BD Transduction Laboratories
Dynamin	monoklonal, Klon 14	Maus	BD Transduction Laboratories
Endophilin B1	polyklonal	Kaninchen	eigene Herstellung
HA-Epitop	monoklonal	Ratte	Roche Diagnostics
HA-Epitop	monoklonal, HRP-konjugiert	Ratte	Roche Diagnostics
Huntingtin	monoklonal	Maus	Chemicon
myc-Epitop	polyklonal, A-14	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologies
PACSIN 1	polyklonal	Kaninchen	M. Plomann, Köln
Synaptojanin 1	polyklonal, 1852	Kaninchen	P. Mc Pherson, Montreal
Amphiphysin 1	monoklonal, Klon 2	Maus	Oncogene Research Products

7.6.2 Sekundärantikörper

Antigen	Antikörper konjugiert mit	Spezies	Hersteller
Maus IgG	HRP	Ziege	Dako
Kaninchen IgG	HRP	Ziege	Dako
Maus IgG	cy2	Ziege	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Maus IgG	cy3	Ziege	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Kaninchen IgG	cy2	Ziege	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Kaninchen IgG	cy3	Ziege	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Maus IgG	Alexa 488	Ziege	Molecular Probes
Kaninchen IgG	Alexa 488	Ziege	Molecular Probes
Ratten IgG	Alexa 488	Ziege	Molecular Probes

7.6.3 Molekulargewichtsstandards für Proteine

Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine wurden folgende Standard-Proteinmischungen verwendet:

High Molecular Weight Marker (Roche Diagnostics): Myosin, 200 kDa; β -Galaktosidase, 116 kDa; Phosphorylase B, 97 kDa; Rinderserumalbumin, 66 kDa; Aldolase, 39 kDa.

Molekulargewichts-Standard für Proteine (Fluka): Myosin, 205 kDa; β -Galaktosidase, 116 kDa; Phosphorylase B, 97 kDa; Rinderserumalbumin, 66 kDa; Ovalbumin, 45 kDa, Carboanhydrase, 29 kDa.

7.7 Biologisches Material

7.7.1 Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
BMH 71-18 <i>mutS</i>	<i>thi-1, supE, Δ(lac-proAB), mutS::Tn10, F' [proAB⁺, lacI^qZΔM15]</i>	Clontech
BL21	<i>hsdS, gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i>	Amersham Pharmacia Biotech
DH5α	<i>supE44, ΔlacU169, (φ80 lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Life Technologies

7.7.2 Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

Der Hefestamm Y190 wurde von Clontech als Teil des Matchmaker2 Two-Hybrid-Systems bezogen.

Hefestamm	Genotyp	Reporter-gen	Selektionsmarker	Literatur
Y190	MATa, <i>ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4d, gal80d, cyh^R2, LYS2:: GAL1_{UAS}- HIS3_{TATA}-HIS3 URA3:: GAL1_{UAS}- GAL1_{TATA}-LacZ</i>	HIS3, LacZ	<i>trp1, leu2, cyh^R2</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993

7.7.3 Eukaryotische Zellen

NIH 3T3 Embryonale Fibroblasten-Zelllinie aus Maus (Jainchill *et al.*, 1969).

8 Literatur

- Ahle, S. und Ungewickell, E. (1986).** Purification and properties of a new clathrin assembly protein. *EMBO J* **5**, 3143-3149.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W. Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990).** Basic local alignment Search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Arneson, L. S., Kunz, J., Anderson, R. A. und Traub, L. M. (1999).** Coupled inositide phosphorylation and phospholipase D activation initiates clathrin-coat assembly on lysosomes. *J Biol Chem* **274**, 17794-17805.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1997).** Short Protocols in Molecular Biology. 3rd edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M. und Schekman, R. (1994).** COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895-907.
- Barlowe, C. und Schekman, R. (1993).** SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* **365**, 347-349.
- Benmerah, A., Bayrou, M., Cerf-Bensussan, N. und Dautry-Varsat, A. (1999).** Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J Cell Sci* **112**, 1303-1311.
- Benmerah, A., Begue, B., Dautry-Varsat, A. und Cerf-Bensussan, N. (1996).** The ear of alpha-adaptin interacts with the COOH-terminal domain of the Eps 15 protein. *J Biol Chem* **271**, 12111-12116.
- Birnboim, H. C. (1983).** A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* **100**, 243-255.
- Burkhardt, J. K. (1996).** In search of membrane receptors for microtubule-based motors - is kinectin a kinesin receptor. *Trends Cell Biol* **6**, 127-131.
- Cao, H., Garcia, F. und McNiven, M. A. (1998).** Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **9**, 2595-2609.

- Carr, J. F. und Hinshaw, J. E. (1997).** Dynamin assembles into spirals under physiological salt conditions upon the addition of GDP and gamma-phosphate analogues. *J Biol Chem* **272**, 28030-28035.
- Cha, J. H., Kosinski, C. M., Kerner, J. A., Alsdorf, S. A., Mangiarini, L., Davies, S. W., Penney, J. B., Bates, G. P. und Young, A. B. (1998).** Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6480-6485.
- Chen, H., Fre, S., Slepnev, V. I., Capua, M. R., Takei, K., Butler, M. H., Di Fiore, P. P. und De Camilli, P. (1998).** Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature* **394**, 793-797.
- Chen, H., Slepnev, V. I., Di Fiore, P. P. und De Camilli, P. (1999).** The interaction of epsin and Eps15 with the clathrin adaptor AP-2 is inhibited by mitotic phosphorylation and enhanced by stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J Biol Chem* **274**, 3257-3260.
- Chen, M., Ona, V. O., Li, M., Ferrante, R. J., Fink, K. B., Zhu, S., Bian, J., Guo, L., Farrell, L. A., Hersch, S. M., Hobbs, W., Vonsattel, J. P., Cha, J. H. und Friedlander, R. M. (2000).** Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* **6**, 797-801.
- Chen, N., Luo, T., Wellington, C., Metzler, M., McCutcheon, K., Hayden, M. R. und Raymond, L. A. (1999b).** Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. *J Neurochem* **72**, 1890-1898.
- Chin, L. S., Nugent, R. D., Raynor, M. C., Vavalle, J. P. und Li, L. (2000).** SNIP, a novel SNAP-25-interacting protein implicated in regulated exocytosis. *J Biol Chem* **275**, 1191-1200.
- Clark, S. G., Stern, M. J. und Horvitz, H. R. (1992).** *C. elegans* cell-signalling gene *sem-5* encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* **356**, 340-344.
- Cousin, H., Gaultier, A., Bleux, C., Darribere, T. und Alfandari, D. (2000).** PACSIN2 is a regulator of the Metalloprotease/Disintegrin ADAM13. *Dev Biol* **227**, 197-210.
- Dautry-Varsat, A. (1986).** Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor. *Biochimie* **68**, 375-381.

- David, C., McPherson, P. S., Mundigl, O. und de Camilli, P. (1996).** A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 331-335.
- Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. A., DiFiglia, M., Sharp, A. H., Ross, C. A., Scherzinger, E., Wanker, E. E., Mangiarini, L. und Bates, G. P. (1997).** Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**, 537-548.
- de Beer, T., Hoofnagle, A. N., Enmon, J. L., Bowers, R. C., Yamabhai, M., Kay, B. K. und Overduin, M. (2000).** Molecular mechanism of NPF recognition by EH domains. *Nat Struct Biol* **7**, 1018-1022.
- de Heuvel, E., Bell, A. W., Ramjaun, A. R., Wong, K., Sossin, W. S. und McPherson, P. S. (1997).** Identification of the major synaptotagmin-binding proteins in brain. *J Biol Chem* **272**, 8710-8716.
- Delcomyn, F. (1997).** *Foundations of Neurobiology*. W. H. Freeman and Company, New York.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J. P., Carraway, R., Reeves, S. A., Boyce, F. M. und Aronin, N. (1995).** Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* **14**, 1075-1081.
- Donaldson, J. G., Cassel, D., Kahn, R. A. und Klausner, R. D. (1992).** ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatamer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6408-6412.
- Doria, M., Salcini, A. E., Colombo, E., Parslow, T. G., Pelicci, P. G. und Di Fiore, P. P. (1999).** The eps15 homology (EH) domain-based interaction between eps15 and hrb connects the molecular machinery of endocytosis to that of nucleocytosolic transport. *J Cell Biol* **147**, 1379-1384.
- Elble, R. (1992).** A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13**, 18-20.
- Engqvist-Goldstein, A. E., Kessels, M. M., Chopra, V. S., Hayden, M. R. und Drubin, D. G. (1999).** An actin-binding protein of the Sla2/Huntingtin interacting protein 1 family is a novel component of clathrin-coated pits and vesicles. *J Cell Biol* **147**, 1503-1518.

- Estes, P. S., Roos, J., van der Blik, A., Kelly, R. B., Krishnan, K. S. und Ramaswami, M. (1996).** Traffic of dynamin within individual *Drosophila* synaptic boutons relative to compartment-specific markers. *J Neurosci* **16**, 5443-5456.
- Fankhauser, C., Reymond, A., Cerutti, L., Utzig, S., Hofmann, K. und Simanis, V. (1995).** The *S. pombe* *cdc15* gene is a key element in the reorganization of F-actin at mitosis. *Cell* **82**, 435-444.
- Fields, S. und Sternglanz, R. (1994).** The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* **10**, 286-292.
- Frischknecht, F., Cudmore, S., Moreau, V., Reckmann, I., Rottger, S. und Way, M. (1999).** Tyrosine phosphorylation is required for actin-based motility of vaccinia but not *Listeria* or *Shigella*. *Curr Biol* **9**, 89-92.
- Gad, H., Ringstad, N., Low, P., Kjaerulff, O., Gustafsson, J., Wenk, M., Di Paolo, G., Nemoto, Y., Crun, J., Ellisman, M. H., De Camilli, P., Shupliakov, O. und Brodin, L. (2000).** Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron* **27**, 301-312.
- Gaidarov, I. und Keen, J. H. (1999).** Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol* **146**, 755-764.
- Ge, K. und Prendergast, G. C. (2000).** Bin2, a functionally nonredundant member of the BAR adaptor gene family. *Genomics* **67**, 210-220.
- Giachino, C., Lantelme, E., Lanzetti, L., Saccone, S., Bella Valle, G. und Migone, N. (1997).** A novel SH3-containing human gene family preferentially expressed in the central nervous system. *Genomics* **41**, 427-434.
- Glick, B. S. und Rothman, J. E. (1987).** Possible role for fatty acyl-coenzyme A in intracellular protein transport. *Nature* **326**, 309-312.
- Goldberg, J. (1999).** Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatamer in GTP hydrolysis. *Cell* **96**, 893-902.
- Goldberg, J. (2000).** Decoding of sorting signals by coatamer through a GTPase switch in the COPI coat complex. *Cell* **100**, 671-679.
- Gonzalez-Gaitan, M. und Jackle, H. (1997).** Role of *Drosophila* alpha-adaptin in presynaptic vesicle recycling. *Cell* **88**, 767-776.

- Guo, Q., Vasile, E. und Krieger, M. (1994).** Disruptions in Golgi structure and membrane traffic in a conditional lethal mammalian cell mutant are corrected by epsilon-COP. *J Cell Biol* **125**, 1213-1224.
- Guo, S., Stolz, L. E., Lemrow, S. M. und York, J. D. (1999).** SAC1-like domains of yeast SAC1, INP52, and INP53 and of human synaptojanin encode polyphosphoinositide phosphatases. *J Biol Chem* **274** (19), p12990-5.
- Haffner, C., Takei, K., Chen, H., Ringstad, N., Hudson, A., Butler, M. H., Salcini, A. E., Di Fiore, P. P. und De Camilli, P. (1997).** Synaptojanin 1: localization on coated endocytic intermediates in nerve terminals and interaction of its 170 kDa isoform with Eps15. *FEBS Lett* **419**, 175-180.
- Hao, W., Luo, Z., Zheng, L., Prasad, K. und Lafer, E. M. (1999).** AP180 and AP-2 interact directly in a complex that cooperatively assembles clathrin. *J Biol Chem* **274**, 22785-22794.
- Harlow, E. und Lane, D. (1988).** Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. und Elledge, S. J. (1993).** The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Haucke, V. und De Camilli, P. (1999).** AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs. *Science* **285**, 1268-1271.
- Hirst, J. und Robinson, M. S. (1998).** Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta* **1404** (1-2), 173-193.
- Hirst, J., Bright, N. A., Rous, B. und Robinson, M. S. (1999).** Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell* **10**, 2787-2802.
- Howard, L., Nelson, K. K., Maciewicz, R. A. und Blobel, C. P. (1999).** Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. *J Biol Chem* **274**, 31693-31699.
- Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993).** A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**, 971-983.

- Hussain, N. K., Yamabhai, M., Ramjaun, A. R., Guy, A. M., Baranes, D., O'Bryan, J. P., Der, C. J., Kay, B. K. und McPherson, P. S. (1999).** Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells. *J Biol Chem* **274**, 15671-15677.
- Huttner, W. B. und Schmidt, A. (2000).** Lipids, lipid modification and lipid-protein interaction in membrane budding and fission - insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 543-551.
- Jainchill, J. L., Aaronson, S. A. und Todaro, G. J. (1969).** Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* **4**, 549-553.
- Jana, N. R., Tanaka, M., Wang, G. und Nukina, N. (2000).** Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Hum Mol Genet* **9**, 2009-2018.
- Kajimoto, Y., Shirai, Y., Mukai, H., Kuno, T. und Tanaka, C. (1993).** Molecular cloning of two additional members of the neural visinin-like Ca^{2+} -binding protein gene family. *J Neurochem* **61**, 1091-1096.
- Kalchman, M. A., Graham, R. K., Xia, G., Koide, H. B., Hodgson, J. G., Graham, K. C., Goldberg, Y. P., Gietz, R. D., Pickart, C. M. und Hayden, M. R. (1996).** Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *J Biol Chem* **271**, 19385-19394.
- Karpuj, M. V., Garren, H., Slunt, H., Price, D. L., Gusella, J., Becher, M. W. und Steinman, L. (1999).** Transglutaminase aggregates huntingtin into nonamyloidogenic polymers, and its enzymatic activity increases in Huntington's disease brain nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7388-7393.
- Kay, B. K., Yamabhai, M., Wendland, B. und Emr, S. D. (1999).** Identification of a novel domain shared by putative components of the endocytic and cytoskeletal machinery. *Protein Sci* **8**, 435-438.
- Kim, M., Lee, H. S., LaForet, G., McIntyre, C., Martin, E. J., Chang, P., Kim, T. W., Williams, M., Reddy, P. H., Tagle, D., Boyce, F. M., Won, L., Heller, A., Aronin, N. und DiFiglia, M. (1999).** Mutant huntingtin expression in clonal striatal cells: dissociation of inclusion formation and neuronal survival by caspase inhibition. *J Neurosci* **19**, 964-973.

- Kirchhausen, T. (2000).** Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 187-198.
- Koenig, J. H. und Ikeda, K. (1989).** Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval. *J Neurosci* **9**, 3844-3860.
- Kudo, M., Saito, S., Sakagami, H., Suzaki, H. und Kondo, H. (1999).** Localization of mRNAs for synaptojanin isoforms in the brain of developing and mature rats. *Brain Res Mol Brain Res* **64**, 179-185.
- Kumar, J., Yu, H. und Sheetz, M. P. (1995).** Kinectin, an essential anchor for kinesin-driven vesicle motility. *Science* **267**, 1834-1837.
- Laemmli, E. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lathrop, R. H., Casale, M., Tobias, D. J., Marsh, J. L. und Thompson, L. M. (1998).** Modeling protein homopolymeric repeats: possible polyglutamine structural motifs for Huntington's disease. *Ismb* **6**, 105-114.
- Lee, A., Frank, D. W., Marks, M. S. und Lemmon, M. A. (1999).** Dominant-negative inhibition of receptor-mediated endocytosis by a dynamin-1 mutant with a defective pleckstrin homology domain. *Curr Biol* **9**, 261-264.
- Lee, S., Francoeur, A.-M., Liu, S. und Wang, E. (1992).** Tissue-specific expression in mammalian brain, heart, and muscle of S1, a member of the elongation factor-1 α gene family. *J Biol Chem* **267**, 24064-24068.
- Li, J., Nishizawa, K., An, W., Hussey, R. E., Lialios, F. E., Salgia, R., Sunder-Plassmann, R. und Reinherz, E. L. (1998).** A cdc15-like adaptor protein (CD2BP1) interacts with the CD2 cytoplasmic domain and regulates CD2-triggered adhesion. *EMBO J* **17**, 7320-7336.
- Lippincott-Schwartz, J., Cole, N. B. und Donaldson, J. G. (1998).** Building a secretory apparatus: role of ARF1/COPI in Golgi biogenesis and maintenance. *Histochem Cell Biol* **109**, 449-462.
- Liu, Y. F., Deth, R. C. und Devys, D. (1997).** SH3 domain-dependent association of huntingtin with epidermal growth factor receptor signaling complexes. *J Biol Chem* **272**, 8121-8124.

- Luthi-Carter, R., Strand, A., Peters, N. L., Solano, S. M., Hollingsworth, Z. R., Menon, A. S., Frey, A. S., Spektor, B. S., Penney, E. B., Schilling, G., Ross, C. A., Borchelt, D. R., Tapscott, S. J., Young, A. B., Cha, J. H. und Olson, J. M. (2000).** Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **9**, 1259-1271.
- Mao, Y., Nickitenko, A., Duan, X., Lloyd, T. E., Wu, M. N., Bellen, H. und Quijcho, F. A. (2000).** Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved in membrane trafficking and signal transduction. *Cell* **100**, 447-456.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S. W. und Bates, G. P. (1996).** Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* **87**, 493-506.
- Mayer, B. J. (1999).** Endocytosis: EH domains lend a hand. *Curr Biol* **9**, 70-73.
- McNiven, M. A., Cao, I., Pitts, K. R. und Yoon, I. (2000).** The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem Sci* **25**, 115-120.
- McPherson, P. S., Takei, K., Schmid, S. L. und De Camilli, P. (1994).** p145, a major Grb2-binding protein in brain, is co-localized with dynamin in nerve terminals where it undergoes activity-dependent dephosphorylation. *J Biol Chem* **269**, 30132-30139.
- McPherson, P. S., Garcia, E. P., Slepnev, V. I., David, C., Zhang, X., Grabs, D., Sossin, W. S., Bauerfeind, R., Nemoto, Y. und De Camilli, P. (1996).** A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* **379**, 353-7.
- Menalled, L., Zanjani, H., MacKenzie, L., Koppel, A., Carpenter, E., Zeitlin, S. und Chesselet, M. F. (2000).** Decrease in striatal enkephalin mRNA in mouse models of Huntington's disease. *Exp Neurol* **162**, 328-342.
- Meriläinen, J., Lehto, V. P. und Wasenius, V. M. (1997).** FAP52, a novel, SH3 domain-containing focal adhesion protein. *J Biol Chem* **272**, 23278-23284.
- Merrifield, C. J., Moss, S. E., Ballestrem, C., Imhof, B. A., Giese, G., Wunderlich, I. und Almers, W. (1999).** Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat Cell Biol* **1**, 72-74.
- Micheva, K. D., Kay, B. K. und McPherson, P. S. (1997).** Synaptotagmin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. *J Biol Chem* **272**, 27239-27245.

- Micheva, K. D., Ramjaun, A. R., Kay, B. K. und McPherson, P. S. (1997b).** SH3 domain-dependent interactions of endophilin with amphiphysin. *FEBS Lett* **414**, 308-312.
- Miki, H., Miura, K. und Takenawa, T. (1996).** N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J* **15**, 5326-5335.
- Modregger, J. (1997).** Isolierung und Charakterisierung von Proteinen, die mit PACSIN wechselwirken. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Modregger, J., Ritter, B., Witter, B., Paulsson, M. und Plomann, M. (2000).** All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *J Cell Sci* **113**, 4511-4521.
- Mongiovi, A. M., Romano, P. R., Panni, S., Mendoza, M., Wong, W. T., Musacchio, A., Cesareni, G. und Paolo Di Fiore, P. (1999).** A novel peptide-SH3 interaction. *EMBO J* **18**, 5300-5309.
- Morgan, J. R., Prasad, K., Hao, W., Augustine, G. J. und Lafer, E. M. (2000).** A conserved clathrin assembly motif essential for synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci* **20**, 8667-8676.
- Moulder, K. L., Onodera, O., Burke, J. R., Strittmatter, W. J. und Johnson, E. M., Jr. (1999).** Generation of neuronal intranuclear inclusions by polyglutamine-GFP: analysis of inclusion clearance and toxicity as a function of polyglutamine length. *J Neurosci* **19**, 705-715.
- Nonet, M. L., Holgado, A. M., Brewer, F., Serpe, C. J., Norbeck, B. A., Holleran, J., Wei, L., Hartwig, E., Jorgensen, E. M. und Alfonso, A. (1999).** UNC-11, a *Caenorhabditis elegans* AP180 homologue, regulates the size and protein composition of synaptic vesicles. *Mol Biol Cell* **10**, 2343-2360.
- Okamoto, P. M., Herskovits, J. S. und Vallee, R. B. (1997).** Role of the basic, proline-rich region of dynamin in Src homology 3 domain binding and endocytosis. *J Biol Chem* **272**, 11629-11635.
- Owen, D. J., Vallis, Y., Noble, M. E., Hunter, J. B., Dafforn, T. R., Evans, P. R. und McMahon, H. T. (1999).** A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain. *Cell* **97**, 805-815.

- Owen, D. J., Vallis, Y., Pearse, B. M., McMahon, H. T. und Evans, P. R. (2000). The structure and function of the beta2-adaptin appendage domain. *EMBO J* **19**, 4216-4227.
- Owen, D. J., Wigge, P., Vallis, Y., Moore, J. D., Evans, P. R. und McMahon, H. T. (1998). Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO J* **17**, p5273-85.
- Peng, R., De Antoni, A. und Gallwitz, D. (2000). Evidence for overlapping and distinct functions in protein transport of coat protein Sec24p family members. *J Biol Chem* **275**, 11521-11528.
- Persichetti, F., Trettel, F., Huang, C. C., Fraefel, C., Timmers, H. T., Gusella, J. F. und MacDonald, M. E. (1999). Mutant huntingtin forms in vivo complexes with distinct context-dependent conformations of the polyglutamine segment. *Neurobiol Dis* **6**, 364-375.
- Petrucci, T. C. und Morrow, J. S. (1987). Synapsin I: an actin-bundling protein under phosphorylation control. *J Cell Biol* **105**, 1355-1363.
- Pfanner, N., Orci, L., Glick, B. S., Amherdt, M., Arden, S. R., Malhotra, V. und Rothman, J. E. (1989). Fatty acyl-coenzyme A is required for budding of transport vesicles from Golgi cisternae. *Cell* **59**, 95-102.
- Plomann, M., Lange, R., Vopper, G., Cremer, H., Heinlein, U. A., Scheff, S., Baldwin, S. A., Leitges, M., Cramer, M., Paulsson, M. und Barthels, D. (1998). PACSIN, a brain protein that is upregulated upon differentiation into neuronal cells. *Eur J Biochem* **256**, 201-211.
- Qualmann, B. und Kelly, R. B. (2000). Syndapin Isoforms Participate in Receptor-mediated Endocytosis and Actin Organization. *J Cell Biol* **148**, 1047-1062.
- Qualmann, B., Kessels, M. M. und Kelly, R. B. (2000). Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **150**, 111-116.
- Qualmann, B., Roos, J., DiGregorio, P. J. und Kelly, R. B. (1999). Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol Biol Cell* **10**, 501-513.
- Ramjaun, A. R. und McPherson, P. S. (1998). Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites. *J Neurochem* **70**, 2369-2376.

- Ramjaun, A. R., Philie, J., de Heuvel, E. und McPherson, P. S. (1999).** The N terminus of amphiphysin II mediates dimerization and plasma membrane targeting. *J Biol Chem* **274**, 19785-19791.
- Reddy, P. H., Williams, M. und Tagle, D. A. (1999).** Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Neurosci* **22**, 248-255.
- Ringstad, N., Gad, H., Low, P., Di Paolo, G., Brodin, L., Shupliakov, O. und De Camilli, P. (1999).** Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* **24**, 143-154.
- Ringstad, N., Nemoto, Y. und De Camilli, P. (1997).** The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8569-8574.
- Ritter, B., (2001).** Doktorarbeit, Universität zu Köln.
- Ritter, B., Modregger, J., Paulsson, M. und Plomann, M. (1999).** PACSIN 2, a novel member of the PACSIN family of cytoplasmic adapter proteins. *FEBS Lett* **454**, 356-362.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T. und Kirschner, M. W. (1999).** The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42- dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**, 221-231.
- Roos, J. und Kelly, R. B. (1998).** Dap160, a neural-specific Eps15 homology and multiple SH3 domain- containing protein that interacts with Drosophila dynamin. *J Biol Chem* **273**, 19108-19119.
- Rosenthal, J. A., Chen, H., Slepnev, V. I., Pellegrini, L., Salcini, A. E., Di Fiore, P. P. und De Camilli, P. (1999).** The epsins define a family of proteins that interact with components of the clathrin coat and contain a new protein module. *J Biol Chem* **274**, 33959-33965.
- Rothman, J. E. (1994).** Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55-63.
- Salcini, A. E., Chen, H., Iannolo, G., De Camilli, P. und Di Fiore, P. P. (1999).** Epidermal growth factor pathway substrate 15, Eps15. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 805-809.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour.

- Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D. und Greenberg, M. E. (1998).** Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* **95**, 55-66.
- Scales, S. J. und Scheller, R. H. (1999).** Lipid membranes shape up. *Nature* **401**, 123-124.
- Schekman, R. und Orci, L. (1996).** Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**, 1526-1533.
- Schilling, G., Becher, M. W., Sharp, A. H., Jinnah, H. A., Duan, K., Kotzuk, J. A., Slunt, H. H., Ratovitski, T., Cooper, J. K., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L., Ross, C. A. und Borchelt, D. R. (1999).** Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum Mol Genet* **8**, 397-407.
- Schmid, S. L., McNiven, M. A. und De Camilli, P. (1998).** Dynamin and its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 504-512.
- Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V., Witke, W., Huttner, W. B. und Söling, H. D. (1999).** Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* **401**, 133-141.
- Schumacher, C., Knudsen, B. S., Ohuchi, T., Di Fiore, P. P., Glassman, R. H. und Hanafusa, H. (1995).** The SH3 domain of Crk binds specifically to a conserved proline-rich motif in Eps15 and Eps15R. *J Biol Chem* **270**, 15341-15347.
- Sengar, A. S., Wang, W., Bishay, J., Cohen, S. und Egan, S. E. (1999).** The EH and SH3 domain Eps proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps15. *EMBO J* **18**, 1159-1171.
- Sever, S., Muhlberg, A. B. und Schmid, S. L. (1999).** Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* **398**, 481-486.
- Shupliakov, O., Low, P., Grabs, D., Gad, H., Chen, H., David, C., Takei, K., De Camilli, P. und Brodin, L. (1997).** Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* **276**, 259-263.
- Simpson, F., Hussain, N. K., Qualmann, B., Kelly, R. B., Kay, B. K., McPherson, P. S. und Schmid, S. L. (1999).** SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nat Cell Biol* **1**, 119-124.

- Sittler, A., Walter, S., Wedemeyer, N., Hasenbank, R., Scherzinger, E., Eickhoff, H., Bates, G. P., Lehrach, H. und Wanker, E. E. (1998).** SH3GL3 associates with the Huntingtin exon 1 protein and promotes the formation of polyglutamine-containing protein aggregates. *Mol Cell* **2**, 427-436.
- Slepnev, V. I. und De Camilli, P. (2000).** Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nature Rev Neurosci* **1**, 161-172.
- Slepnev, V. I., Ochoa, G. C., Butler, M. H. und De Camilli, P. (2000).** Tandem arrangement of the clathrin and AP-2 binding domains in amphiphysin 1 and disruption of clathrin coat function by amphiphysin fragments comprising these sites. *J Biol Chem* **275**, 17583-17589.
- Smith, C. J., Grigorieff, N. und Pearse, B. M. (1998).** Clathrin coats at 21 Å resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors. *EMBO J* **17**, 4943-4953.
- So, C. W., Caldas, C., Liu, M. M., Chen, S. J., Huang, Q. H., Gu, L. J., Sham, M. H., Wiedemann, L. M. und Chan, L. C. (1997).** EEN encodes for a member of a new family of proteins containing an Src homology 3 domain and is the third gene located on chromosome 19p13 that fuses to MLL in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2563-2568.
- So, C. W., Sham, M. H., Chew, S. L., Cheung, N., So, C. K., Chung, S. K., Caldas, C., Wiedemann, L. M. und Chan, L. C. (2000).** Expression and protein-binding studies of the EEN gene family, new interacting partners for dynamin, synaptojanin and huntingtin proteins. *Biochem J* **348**, 447-458.
- Spang, A. und Schekman, R. (1998).** Reconstitution of retrograde transport from the Golgi to the ER in vitro. *J Cell Biol* **143**, 589-599.
- Sparks, A. B., Hoffman, N. G., McConnell, S. J., Fowlkes, D. M. und Kay, B. K. (1996).** Cloning of ligand targets: systematic isolation of SH3 domain-containing proteins. *Nat Biotechnol* **14**, 741-744.
- Spencer, S., Dowbenko, D., Cheng, J., Li, W., Brush, J., Utzig, S., Simanis, V. und Lasky, L. A. (1997).** PSTPIP: a tyrosine phosphorylated cleavage furrow-associated protein that is a substrate for a PEST tyrosine phosphatase. *J Cell Biol* **138**, 845-860.
- Springer, S. und Schekman, R. (1998).** Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs. *Science* **281**, 698-700.

- Stowell, M. H., Marks, B., Wigge, P. und McMahon, H. T. (1999).** Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat Cell Biol* **1**, 27-32.
- Sweitzer, S. M. und Hinshaw, J. E. (1998).** Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* **93**, 1021-1029.
- Takei, K., McPherson, P. S., Schmid, S. L. und De Camilli, P. (1995).** Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature* **374**, 186-190.
- Takei, K., Slepnev, V. I., Haucke, V. und De Camilli, P. (1999).** Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* **1**, 33-39.
- Tang, Y., Hu, L. A., Miller, W. E., Ringstad, N., Hall, R. A., Pitcher, J. A., DeCamilli, P. und Lefkowitz, R. J. (1999).** Identification of the endophilins (SH3p4/p8/p13) as novel binding partners for the beta1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12559-12564.
- Tebar, F., Bohlander, S. K. und Sorkin, A. (1999).** Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Mol Biol Cell* **10**, 2687-2702.
- Tebar, F., Sorkina, T., Sorkin, A., Ericsson, M. und Kirchhausen, T. (1996).** Eps15 is a component of clathrin-coated pits and vesicles and is located at the rim of coated pits. *J Biol Chem* **271**, 28727-28730.
- Tobin, A. J. und Signer, E. R. (2000).** Huntington's disease: the challenge for cell biologists. *Trends Cell Biol* **10**, 531-536.
- Toyoshima, I., Yu, H., Steuer, E. R. und Sheetz, M. P. (1992).** Kinectin, a major kinesin-binding protein on ER. *J Cell Biol* **118**, 1121-1131.
- Traub, L. M., Downs, M. A., Westrich, J. L. und Fremont, D. H. (1999).** Crystal structure of the alpha appendage of AP-2 reveals a recruitment platform for clathrin-coat assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8907-8912.
- Vallis, Y., Wigge, P., Marks, B., Evans, P. R. und McMahon, H. T. (1999).** Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol* **9**, 257-260.

- Wang, L. H., Südhof, T. C. und Anderson, R. G. (1995).** The appendage domain of alpha-adaptin is a high affinity binding site for dynamin. *J Biol Chem* **270**, 10079-10083.
- Warnock, D. E., Hinshaw, J. E. und Schmid, S. L. (1996).** Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. *J Biol Chem* **271**, 22310-22314.
- Weeks, R. A., Piccini, P., Harding, A. E. und Brooks, D. J. (1996).** Striatal D1 and D2 dopamine receptor loss in asymptomatic mutation carriers of Huntington's disease. *Ann Neurol* **40**, 49-54.
- Weigert, R., Silletta, M. G., Spano, S., Turacchio, G., Cericola, C., Colanzi, A., Senatore, S., Mancini, R., Polishchuk, E. V., Salmona, M., Facciano, F., Burger, K. N., Mironov, A., Luini, A. und Corda, D. (1999).** CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid. *Nature* **402**, 429-433.
- Wigge, P. und McMahon, H. T. (1998).** The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci* **21**, 339-344.
- Wilkinson, F., Nguyen, T. M. und Morris, G. E. (1997).** Monoclonal antibodies from three new regions of huntingtin, the Huntington's disease protein. *Biochem Soc Trans* **25**, 51.
- Wood, J. D., MacMillan, J. C., Harper, P. S., Lowenstein, P. R. und Jones, A. L. (1996).** Partial characterisation of murine huntingtin and apparent variations in the subcellular localisation of huntingtin in human, mouse and rat brain. *Hum Mol Genet* **5**, 481-487.
- Woscholski, R., Finan, P. M., Radley, E. und Parker, P. J. (1998).** Identification and characterisation of a novel splice variant of synaptojanin1. *FEBS Lett* **432**, 5-8.
- Wu, Y., Spencer, S. D. und Lasky, L. A. (1998).** Tyrosine phosphorylation regulates the SH3-mediated binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to PSTPIP, a cytoskeletal-associated protein. *J Biol Chem* **273**, 5765-5770.
- Yamamoto, A., Lucas, J. J. und Hen, R. (2000).** Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* **101**, 57-66.
- Ye, W. und Lafer, E. M. (1995).** Bacterially expressed F1-20/AP-3 assembles clathrin into cages with a narrow size distribution: implications for the regulation of quantal size during neurotransmission. *J Neurosci Res* **41**, 15-26.

- Yu, H., Chen, J. K., Feng, S., Dalgarno, D. C., Brauer, A. W. und Schreiber, S. L. (1994).** Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**, 933-945.
- Zeitlin, S., Liu, J. P., Chapman, D. L., Papaioannou, V. E. und Efstratiadis, A. (1995).** Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet* **11**, 155-163.
- Zhang, B., Koh, Y. H., Beckstead, R. B., Budnik, V., Ganetzky, B. und Bellen, H. J. (1998).** Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. *Neuron* **21**, 1465-1475.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen beantragten Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht ist sowie, daß ich eine Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. M. Paulsson betreut worden.

Köln, den 20.02.2001

Teilpublikationen

Ritter, B., Modregger, J., Paulsson, M. und Plomann, M. (1999). PACSIN 2, a novel member of the PACSIN family of cytoplasmic adapter proteins. *FEBS Lett* **454**, 356-362.

Modregger, J., Ritter, B., Witter, B., Paulsson, M. und Plomann, M. (2000). All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *J Cell Sci* **113**, 4511-4521.

Hilton, J. M., Plomann, M., Modregger, J., Ritter, B., Freeman, H. N., Falck, J. R., Krishna, U. M. und Tobin, A. B. (2001). Phosphorylation of a synaptic vesicle associated protein by an inositol hexakisphosphate-regulated kinase. Zur Veröffentlichung im *Journal of Biological Chemistry* eingereicht.

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Protein-Protein-Wechselwirkungen von PACSIN 1 identifiziert und charakterisiert. Ausgangspunkt waren potentielle Bindungspartner von PACSIN 1, die mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems identifiziert worden waren.

PACSIN 1 ist ein hauptsächlich in terminal differenzierten Neuronen exprimiertes Adapterprotein der PACSIN-Proteinfamilie. Gemeinsam mit PACSIN 2 und 3 besitzt PACSIN 1 die aminoterminalen CDC15NT-Region und die carboxyterminalen Protein-Protein-Interaktionsregionen, in denen PACSIN 1 zwei NPF-Motive und eine konservierte SH3-Domäne aufweist. Alle PACSIN-Proteine sind an der clathrinvermittelten Endozytose beteiligt und interagieren außer mit endozytotischen Proteinen wie Dynamin, Synaptojanin und Synapsin auch mit N-WASP, einem Regulator des Actin-Zytoskeletts. Die PACSIN-Proteine sind daher vermutlich sowohl an der Endozytose selbst, wie auch an der Reorganisation des Actin-Zytoskeletts während der Endozytose oder am Transport von Vesikeln mittels Actin-Polymerisation beteiligt.

Durch Einführung von Deletions- und Punktmutationen in PACSIN 1 wurden die Bindungsmotive auf PACSIN-Seite genauer bestimmt und SH3-bindende Interaktionspartner näher untersucht.

Die Interaktion mit 18-1, einem hirnspezifisch exprimierten, sehr prolinreichen Protein, wurde auf proteinchemischer Ebene bestätigt. Die intrazelluläre Verteilung von 18-1, die zwischen einer zytosolischen und einer nukleären Lokalisation wechselt, läßt eine Beteiligung von 18-1 an der Regulation der Endozytose oder am nukleozytosolischen Transport vermuten. Die Interaktionen von PACSIN 1 mit den Klonen 42-14 und 48-9 konnten nicht auf Proteinebene bestätigt werden. Klon 48-9 wurde jedoch weiter charakterisiert, da er für eine neue Endophilin-Isoform kodierte. Das neu entdeckte Endophilin B1 besitzt ebenfalls Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase-Aktivität wie die bekannten Endophilinen, ist aber nicht an der clathrinvermittelten Endozytose beteiligt und unterscheidet sich in seinen Bindungspartnern und der intrazellulären Lokalisierung von den Endophilinen A1, A2 und A3.

Durch proteinchemische Analysen wurde Huntingtin als weiterer SH3-Bindungspartner von PACSIN 1 und den Endophilinen A1 und B1 identifiziert. Huntingtin kann durch eine Verlängerung einer aminoterminalen Glutaminregion die neurodegenerative Erkrankung *Chorea Huntington* auslösen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine wichtige Beteiligung von PACSIN 1 an der progressiven Pathogenese von *Chorea Huntington* in frühen Phasen der Erkrankung hin.

Abstract

PACSIN 1 was identified as the first of three members of the PACSIN protein family of cytoplasmic adaptor proteins involved in vesicle formation and transport. PACSIN 1 is predominantly expressed in neural tissues and shares its aminoterminal CDC15NT region and a carboxyterminal protein-protein interaction region including an SH3 domain with the other family members. PACSIN 1 additionally contains two asparagine-proline-phenylalanine motifs for interactions with EH domains. The PACSIN proteins interact with endocytic proteins like dynamin, synaptojanin, and synapsin and with a regulator of the actin cytoskeleton, N-WASP. Therefore the PACSIN protein family is likely to be involved in the connection between endocytosis and reorganization of actin cytoskeleton or vesicle transport by actin polymerization.

The main focus of this thesis was the analysis of PACSIN 1 interactions and characterization of novel SH3 binding partners of PACSIN 1. In the yeast two-hybrid system the clones 18-1, 42-14 and 48-9 were found to interact with the PACSIN 1 SH3 domain.

The interaction of PACSIN 1 and 18-1 was confirmed by precipitation assays. The intracellular localization of the brain-specific proline-rich protein 18-1 suggests a possible role in nuclear-cytosolic shuttling or regulation of clathrin mediated endocytosis by 18-1. Although the interactions of 42-14 and 48-9 with PACSIN 1 could not be verified on the protein level, clone 48-9 was further characterized because of its similarity to the endocytic lysophosphatidic acid acyl transferases (LPAAT) endophilin A1-A3. The novel isoform endophilin B1 was shown to exhibit LPAAT activity, but its overexpression did not inhibit endocytosis of clathrin coated vesicles. The differences in the binding behavior and intracellular localization of the novel endophilin compared to the known endophilins suggest a role different from clathrin mediated endocytosis in vesicle budding from intracellular compartments.

Huntingtin was identified as an additional interaction partner of PACSIN 1 and endophilin A1 and B1 by overlay and pull down assays. Huntingtin causes the inherited neurodegenerative Huntington's disease by expansion of an aminoterminal polyglutamine region. The influence of the length of polyglutamine stretch on the interactions with PACSIN 1 and endophilin B1 indicates a possible role of these proteins in the progressive pathology and cell specificity of the disease.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jan Dieter Modregger
Geburtsdatum	07. 06. 1972
Geburtsort	Köln
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Anschrift	Kirburger Weg 103, 50767 Köln

Schulbildung

1978-1981	Städtische Gemeinschaftsgrundschule Köln-Lindweiler
1981-1982	Gemeinschaftsgrundschule Schmitzhöhe
1982-1991	Albertus-Magnus-Gymnasium Bensberg, Abschluß mit der Allgemeinen Hochschulreife

Wehrdienst

1991-1992	Luftwaffe, Köln
-----------	-----------------

Studium

1992	Immatrikulation an der Universität zu Köln, Studiengang Chemie (Diplom)
1994	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
1997	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
1997	Diplomarbeit am Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, Betreuer: Prof. Dr. M. Paulsson, Thema: „Isolierung und Charakterisierung von Proteinen, die mit PACSIN wechselwirken.“
1997-2001	Promotion am Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, Betreuer: Prof. Dr. M. Paulsson, Thema: „PACSIN und seine SH3-Bindungspartner: Wechselwirkungen und Funktionen“

Wissenschaftliche Tätigkeiten

1997	Studentische Hilfskraft am Institut für Biochemie II
1997-1998	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie II
1998-2000	Stipendiat des Fonds der Chemischen Industrie
2000-2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie II